

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**



日 本 国 特 許 庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application:

1 9 9 9 年 4 月 5 日

出 願 番 号  
Application Number:

平成 1 1 年特許願第 0 9 8 2 0 5 号

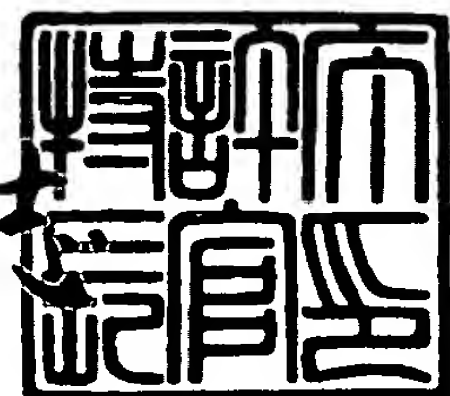
出 願 人  
Applicant (s):

ダイセル化学工業株式会社

1 9 9 9 年 8 月 3 1 日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Patent Office

伴 佐 山 建 志



出証番号 出証特平 1 1 - 3 0 6 1 3 9 1

【書類名】 特許願

【整理番号】 D1-003DP2

【提出日】 平成11年 4月 5日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12P 7/62

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市千現 1 - 1 4 - 1 4 - 1 0 3

    【氏名】 山本 浩明

【特許出願人】

    【識別番号】 000002901

    【氏名又は名称】 ダイセル化学工業株式会社

    【代表者】 児島 章郎

【代理人】

    【識別番号】 100102978

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

    【識別番号】 100108774

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 橋本 一憲

【先の出願に基づく優先権主張】

    【出願番号】 平成10年特許願第126507号

    【出願日】 平成10年 5月 8日

【先の出願に基づく優先権主張】

    【出願番号】 平成10年特許願第300178号

    【出願日】 平成10年10月21日

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 041092

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】	明細書	1
【物件名】	図面	1
【物件名】	要約書	1
【プルーフの要否】	要	

【書類名】 明細書

【発明の名称】 光学活性 4－ハロ－3－ヒドロキシ酪酸エステルの製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 II型の脂肪酸合成酵素を構成する  $\beta$ －ケトアシル－アシルキャリアープロテイン還元酵素を用い、4－ハロアセト酢酸エステルまたはその誘導体を不斉還元することを特徴とする、(S)－4－ハロ－3－ヒドロキシ酪酸エステルの製造方法。

【請求項 2】  $\beta$ －ケトアシル－アシルキャリアープロテイン還元酵素が大腸菌由来である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】  $\beta$ －ケトアシル－アシルキャリアープロテイン還元酵素が下記 (a) から (c) より選択される、請求項 1 に記載の方法。

(a) 配列番号：1 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) 配列番号：1 に記載のアミノ酸配列において 1 または複数のアミノ酸が付加、欠失または置換したアミノ酸配列からなり、4－ハロアセト酢酸エステルまたはその誘導体を不斉還元し、(S)－4－ハロ－3－ヒドロキシ酪酸エステルを生成する活性を有するタンパク質。

(c) 配列番号：2 に記載の塩基配列からなる DNA とハイブリダイズする DNA がコードするタンパク質であって、4－ハロアセト酢酸エステルまたはその誘導体を不斉還元し、(S)－4－ハロ－3－ヒドロキシ酪酸エステルを生成する活性を有するタンパク質。

【請求項 4】  $\beta$ －ケトアシル－アシルキャリアープロテイン還元酵素がバチルス属に属する微生物由来である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】  $\beta$ －ケトアシル－アシルキャリアープロテイン還元酵素がバチルス・サブチリス由来である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】  $\beta$ －ケトアシル－アシルキャリアープロテイン還元酵素が下記 (a) から (c) より選択される、請求項 1 に記載の方法。

(a) 配列番号：5 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) 配列番号：5 に記載のアミノ酸配列において 1 または複数のアミノ酸が付加、欠失または置換したアミノ酸配列からなり、4－ハロアセト酢酸エステルま

たはその誘導体を不斉還元し、(S) - 4 - ハロ - 3 - ヒドロキシ酪酸エステルを生成する活性を有するタンパク質。

(c) 配列番号：6 に記載の塩基配列からなる DNA とハイブリダイズする DNA がコードするタンパク質であって、4 - ハロアセト酢酸エステルまたはその誘導体を不斉還元し、(S) - 4 - ハロ - 3 - ヒドロキシ酪酸エステルを生成する活性を有するタンパク質。

【請求項 7】 ポリ -  $\beta$  - ヒドロキシ脂肪酸生合成系を構成するアセトアセチル - C o A 還元酵素を用い、4 - ハロアセト酢酸エステルもしくはその誘導体を不斉還元することを特徴とする、(S) - 4 - ハロ - 3 - ヒドロキシ酪酸エステルの製造方法。

【請求項 8】 アセトアセチル - C o A 還元酵素がラルストニア属に属する微生物由来である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】 アセトアセチル - C o A 還元酵素がラルストニア・ユートロファ由来である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】 アセトアセチル - C o A 還元酵素が下記 (a) から (c) より選択される、請求項 7 に記載の方法。

(a) 配列番号：9 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) 配列番号：9 に記載のアミノ酸配列において 1 または複数のアミノ酸が付加、欠失または置換したアミノ酸配列からなり、4 - ハロアセト酢酸エステルもしくはその誘導体を不斉還元し、(S) - 4 - ハロ - 3 - ヒドロキシ酪酸エステルを生成する活性を有するタンパク質。

(c) 配列番号：10 に記載の塩基配列からなる DNA とハイブリダイズする DNA がコードするタンパク質であって、4 - ハロアセト酢酸エステルもしくはその誘導体を不斉還元し、(S) - 4 - ハロ - 3 - ヒドロキシ酪酸エステルを生成する活性を有するタンパク質。

【請求項 11】 4 - ハロアセト酢酸エステルが 4 - クロロアセト酢酸エステルである、請求項 1 または 7 に記載の方法。

【請求項 12】 4 - ハロアセト酢酸エステルが 4 - クロロアセト酢酸エチルエステルである、請求項 1 または 7 に記載の方法。

【請求項 1 3】 II型の脂肪酸合成酵素を構成する  $\beta$ -ケトアシル-アシルキャリアープロテイン還元酵素と  $\text{NAD(P)}^+$  から  $\text{NAD(P)H}$  を生成する活性を有する酵素とを生産する微生物を用いることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 4】 微生物が、異種または同種のII型脂肪酸合成酵素を構成する  $\beta$ -ケトアシル-アシルキャリアープロテイン還元酵素をコードするDNAと  $\text{NAD(P)}^+$  から  $\text{NAD(P)H}$  を生成する活性を有する酵素をコードするDNAとを導入され、両酵素を発現する組換え微生物である、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】 微生物が大腸菌である、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】  $\text{NAD(P)}^+$  から  $\text{NAD(P)H}$  を生成する活性を有する酵素がグルコース脱水素酵素である、請求項 1 3 から 1 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 7】 ポリ- $\beta$ -ヒドロキシ脂肪酸生合成系を構成するアセトアセチル- $\text{CoA}$ 還元酵素と  $\text{NAD(P)}^+$  から  $\text{NAD(P)H}$  を生成する活性を有する酵素とを生産する微生物を用いることを特徴とする、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 1 8】 微生物が、異種または同種のポリ- $\beta$ -ヒドロキシ脂肪酸生合成系を構成するアセトアセチル- $\text{CoA}$ 還元酵素をコードするDNAと  $\text{NAD(P)}^+$  から  $\text{NAD(P)H}$  を生成する活性を有する酵素をコードするDNAとを導入され、両酵素を発現した組換え微生物である、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】 微生物が大腸菌である、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】  $\text{NAD(P)}^+$  から  $\text{NAD(P)H}$  を生成する活性を有する酵素がグルコース脱水素酵素である、請求項 1 7 から 1 9 のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、II型の脂肪酸合成酵素を構成する $\beta$ -ケトアシル-アシルキャリアー  
プロテイン還元酵素またはアセトアセチル-CoA還元酵素を利用した、(S)-4-ハロ  
-3-ヒドロキシ酪酸エステルの製造方法に関する。

## 【0002】

## 【従来の技術】

従来、光学活性(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルの製造方法としては、 $\alpha$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素を用いた不斉還元法（特開平1-277494号公  
報）、パン酵母など微生物を用いた不斉還元法（J. Am. Chem. Soc. 105, 5925-  
5926 (1983)、特開昭61-146191号公報等）などが知られている。パン酵母におい  
て4-ハロアセト酢酸エステルを還元し(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルを  
生成する酵素として、D-enzyme-1, D-enzyme-2 (J. Org. Chem. 56, 4778-4783 (19  
91))が報告されている。これらのうち、D-enzyme-2は、分子量などから脂肪酸合  
成酵素であることが示唆されている（J. Am. Chem. Soc. 107, 2993-2993 (1985)）  
。

## 【0003】

しかしながら、パン酵母を用いた4-ハロアセト酢酸エステルの還元による光学  
活性(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルの合成は、活性が低く、高濃度で蓄  
積させることが困難であり、また、パン酵母中に4-ハロアセト酢酸エステルを還  
元して(R)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルを生成する酵素が存在するため、  
高い光学純度の(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルを安定して合成すること  
は困難である。

## 【0004】

また、パン酵母において(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルの合成に主に  
関与している脂肪酸合成酵素は、ヨードアセトアミド、水銀、パラクロロ水銀安  
息香酸などのSH試薬により迅速に阻害されることが報告されており、基質である  
4-ハロアセト酢酸エステル、生成物である4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルに  
より阻害されることが予想され、(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルを高濃  
度で蓄積させるには好ましくない。

## 【0005】



さらに、パン酵母の脂肪酸合成酵素を遺伝子工学的手法を用いて、異種微生物などにおいて高発現し、高活性で、高い光学純度の(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルを合成することも考えられるが、パン酵母の脂肪酸合成酵素は、1894アミノ酸で分子量20万8千の $\alpha$ -サブユニットと、2051アミノ酸で分子量22万9千の $\beta$ -サブユニット(J. Biol. Chem. 263, 12315-12325(1988))が $\alpha 6 \beta 6$ の複合体を形成しており(J. Biol. Chem. 253, 4464-4475(1978))、 $\beta$ -ケト基の還元活性( $\beta$ -ケトアシル-ACP還元活性)だけではなく、アシルキャリアープロテイン(ACP)活性、ACP-S-アセチルトランスフェラーゼ活性、ACP-S-マロニルトランスフェラーゼ活性、 $\beta$ -ケトアシル-ACP合成酵素活性、 $\beta$ -ヒドロキシアシル-ACP脱水素酵素活性、エノイル-ACP還元酵素活性およびパルミチルトランスフェラーゼ活性の8種類の活性を有するきわめて複雑な多機能酵素であり、異種微生物で高発現させることは容易ではない。例えば、大腸菌のミニセルで、FAS1, FAS2を発現させたが、全長鎖は検出できなかったと報告されている(Ann. Rev. Biochem. 52, 537-579(1983))。

## 【 0 0 0 6 】

また、脂肪酸合成酵素の中で、4-ハロアセト酢酸エステル還元酵素活性を担っていると予想される $\beta$ -ケトアシル-ACP還元活性を担うドメインは、 $\alpha$ -サブユニットに存在することがアミノ酸配列から示唆されているが、高塩濃度下での凍結融解(Biochem. J. 109, 312-314(1968))やジメチルマレイン酸無水物(dimethyl maleic anhydride)によるリジンの修飾により完全に解離させた $\alpha$ -サブユニット単独では $\beta$ -ケトアシル-ACP還元活性を示さないことが報告されている(Eur. J. Biochem. 94, 189-197(1979))。また、アセト酢酸エチルエステル還元活性は $\alpha 6 \beta 6$ 構造の脂肪酸合成酵素では示さず、 $\alpha 2 \beta 2$ 構造(分子量80万)でのみアセト酢酸エチルエステル還元活性を示すとの報告(Eur. J. Biochem. 172, 633-639(1988))もあり、脂肪酸合成酵素の4-ハロアセト酢酸還元活性の発現にどの領域が必須であるか、また、4-ハロアセト酢酸エステル還元活性を示す構造( $\alpha 2 \beta 2$ )を如何にして効率的に作製するかは明確ではない。

## 【 0 0 0 7 】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、脂肪酸合成酵素を構成する酵素またはポリ- $\beta$ -ヒドロキシ脂肪酸生合成系を構成する酵素を利用した、効率的な(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルの製造方法を提供することを課題とする。

## 【0008】

## 【課題を解決するための手段】

脂肪酸合成酵素は、その構造から以下の4つのタイプ(IA, IB, IC, II型)に分類される(新生化学実験講座 4 脂質 I, p34-37)。ヒト(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92, 8695(1995))などの動物は、分子量25万程度の $\alpha$ サブユニットのホモ二量体(分子量約50万)が上記8種類の脂肪酸合成酵素活性全てを有するIA型を有する。パン酵母を含め酵母やカビは、分子量約21万の $\alpha$ -サブユニットと約20万の $\beta$ -サブユニットが $\alpha 6 \beta 6$ 構造(分子量約240万)を有し、 $\alpha 6 \beta 6$ 構造において、脂肪酸合成酵素活性全てを発現するIB型を有する。ブレヴィバクテリウム・アンモニアゲネス(*Brevibacterium ammoniagenes*, Eur. J. Biochem. 247, 268(1997))やミコバクテリウム・スメグマティス(*Mycobacterium smegmatis*, Physiol. Rev. 56, 339(1976))などの細菌では分子量約25万の $\alpha$ -サブユニットが $\alpha 6$ 構造を有し、脂肪酸合成酵素活性全てを有するIC型を有する。セイヨウアブラナ(*Brassica napus*, Biochim. Biophys. Acta. 1120, 151(1992))などの植物や藻類、大腸菌(*Escherichia coli*)などの細菌、放線菌、ウイルスなどにおいては、脂肪酸合成酵素を構成する個々の反応が別々の酵素蛋白質により行われているII型を有する。

## 【0009】

本発明者らは、これら種々の型の酵素の中で、II型の脂肪酸合成酵素に含まれる $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素が、I型酵素(IA, IB, IC)に比べて構造並びに機能が単純で、分子量も小さく(サブユニットの分子量が20,000-40,000程度)、SH試薬で阻害されないという特徴を有することに着目し、該酵素が、パン酵母のIB型脂肪酸合成酵素同様に、4-ハロアセト酪酸エステルを還元して(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルを合成する活性を有すれば、(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルの高濃度での蓄積や遺伝子組換え技術を利用した(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステル高生産株の調製を行うことが可能であると考えた。

## 【0 0 1 0】

そこで、本発明者らは、II型の脂肪酸合成酵素を構成する $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素の単離、およびその4-ハロアセト酢酸エステルに対する還元活性の検討を試みた。具体的には、塩基配列が報告されている大腸菌または枯草菌（バチルス・サブチリス）の $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素遺伝子を、それぞれ大腸菌染色体DNAまたは枯草菌染色体DNAを鋳型としたポリメラーゼ連鎖反応を行うことによりクローニングし、次いで、単離した遺伝子を大腸菌に導入して該酵素を大腸菌内で高発現させ、該酵素の4-クロロアセト酢酸エステル還元活性の検討を行った。その結果、本発明者らは、該酵素が、4-クロロアセト酢酸エステルに対して極めて高い還元活性及び立体選択性を有することを見いだした。

## 【0 0 1 1】

また、大腸菌の $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素は、 $\beta$ -ヒドロキシブチル-ACPに対して、D体特異的に酸化活性を示すことが報告されている（J. Biol. Chem. 240, 618-621(1965)）が、本発明者らは、該酵素並びに枯草菌由来の酵素が、4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルエステルに対しては、いずれの立体配置に対してもほとんど酸化活性を示さず、4-クロロアセト酢酸エチルに対しては還元のみを行うことを見出した。この性質は、不斉還元による光学活性(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステル合成において、平衡が律速とならないため、極めて好ましい性質である。

## 【0 0 1 2】

さらに、本発明者らは、II型の脂肪酸合成酵素をコードする遺伝子（一般にfabGと命名されている）とホモロジーを有する遺伝子として、ポリ- $\beta$ -ヒドロキシ脂肪酸（PHA）生合成系を構成する酵素の1つであるアセトアセチル-CoA還元酵素遺伝子（一般にphbBまたはphaBと命名されている）を見出し、これらアセトアセチル-CoA還元酵素が、 $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素と同様に、4-クロロアセト酢酸エステルを(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルに不斉還元する能力を有するか否かを検討した。具体的には、アセトアセチル-CoA還元酵素遺伝子をラルストニア・ユートロファ（*Ralstonia eutropha*）より単離し、大腸菌に導入して発現させ、発現させたアセトアセチル-CoA還元酵素を用いて4-クロロアセト酢酸

エステル還元反応を行った。その結果、該酵素が高い還元活性および高い立体選択性を持って(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルを生成することを見出した。

## 【 0 0 1 3 】

また、アセトアセチル-CoA還元酵素が、 $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素と同様に、4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルのいずれの光学異性体に対してもほとんど反応せず、事実上の還元酵素として作用するという、(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エステル合成にとって好ましい性質を有することを見出した。

## 【 0 0 1 4 】

さらに、本発明者らは、還元反応の反応系において、4-ハロアセト酢酸エステルの不斉還元と共に、この反応に付随して消費される補酵素(NADPHもしくはNADH)の再生を併行して行わせることにより、還元反応のサイクルを効率的に進行させることを考えた。そこで、まず、補酵素(NADPHもしくはNADH)の再生を行う能力を有するグルコース脱水素酵素をコードする遺伝子と $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素をコードする遺伝子の双方が導入され、これら両酵素を生産する大腸菌を調製した。次いで、該大腸菌を用いた4-ハロアセト酢酸エチルの還元反応を行い、生産された(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルの定量並びに光学純度の測定を行った。その結果、該大腸菌により生産される組み換え酵素が高い酵素活性を有し、光学純度の高い(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルの生産に非常に適していることを見出した。

## 【 0 0 1 5 】

すなわち、本発明は、II型の脂肪酸合成酵素を構成する酵素である $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素またはポリ- $\beta$ -ヒドロキシ脂肪酸生合成系を構成する酵素の1つであるアセトアセチル-CoA還元酵素を4-ハロアセト酢酸エステルまたはその誘導体に作用させて、(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルを生産する方法に関し、より具体的には、

(1) II型の脂肪酸合成酵素を構成する酵素である $\beta$ -ケトアシル-アシルキャリアープロテイン還元酵素を用い、4-ハロアセト酢酸エステルもしくはその誘導体を不斉還元することを特徴とする、(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルの

製造方法、

(2)  $\beta$ -ケトアシル-アシルキャリアープロテイン還元酵素が大腸菌由来である、(1)に記載の方法、

(3)  $\beta$ -ケトアシル-アシルキャリアープロテイン還元酵素が下記 (a) から (c) より選択される、(1)に記載の方法、

(a) 配列番号：1に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) 配列番号：1に記載のアミノ酸配列において1または複数のアミノ酸が付加、欠失または置換したアミノ酸配列からなり、4-ハロアセト酢酸エステルまたはその誘導体を不斉還元し、(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルを生成する活性を有するタンパク質。

(c) 配列番号：2に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、4-ハロアセト酢酸エステルまたはその誘導体を不斉還元し、(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルを生成する活性を有するタンパク質。

(4)  $\beta$ -ケトアシル-アシルキャリアープロテイン還元酵素がバチルス属に属する微生物由来である、(1)に記載の方法、

(5)  $\beta$ -ケトアシル-アシルキャリアープロテイン還元酵素がバチルス・サブチリス由来である、(4)に記載の方法、

(6)  $\beta$ -ケトアシル-アシルキャリアープロテイン還元酵素が下記 (a) から (c) より選択される、(1)に記載の方法、

(a) 配列番号：5に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) 配列番号：5に記載のアミノ酸配列において1または複数のアミノ酸が付加、欠失または置換したアミノ酸配列からなり、4-ハロアセト酢酸エステルまたはその誘導体を不斉還元し、(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルを生成する活性を有するタンパク質。

(c) 配列番号：6に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、4-ハロアセト酢酸エステルまたはその誘導体を不斉還元し、(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルを生成する活性を有するタンパク質。

(7) ポリ- $\beta$ -ヒドロキシ脂肪酸生合成系を構成するアセトアセチル-CoA還元酵素を用い、4-ハロアセト酢酸エステルもしくはその誘導体を不斉還元することを特徴とする、(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルの製造方法、

(8) アセトアセチル-CoA還元酵素がラルストニア属に属する微生物由来である、(7)に記載の方法、

(9) アセトアセチル-CoA還元酵素がラルストニア・ユートロファ由来である、(8)に記載の方法、

(10) アセトアセチル-CoA還元酵素が下記(a)から(c)より選択される、(7)に記載の方法、

(a) 配列番号：9に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) 配列番号：9に記載のアミノ酸配列において1または複数のアミノ酸が付加、欠失または置換したアミノ酸配列からなり、4-ハロアセト酢酸エステルもしくはその誘導体を不斉還元し、(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルを生成する活性を有するタンパク質。

(c) 配列番号：10に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、4-ハロアセト酢酸エステルもしくはその誘導体を不斉還元し、(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルを生成する活性を有するタンパク質。

(11) 4-ハロアセト酢酸エステルが4-クロロアセト酢酸エステルである、(1)または(7)に記載の方法、

(12) 4-ハロアセト酢酸エステルが4-クロロアセト酢酸エチルエステルである、(1)または(7)に記載の方法、

(13) II型の脂肪酸合成酵素を構成する $\beta$ -ケトアシル-アシルキャリアープロテイン還元酵素とNAD(P)<sup>+</sup>からNAD(P)Hを生成する活性を有する酵素とを生産する微生物を用いることを特徴とする、(1)に記載の方法、

(14) 微生物が、異種または同種のII型脂肪酸合成酵素を構成する $\beta$ -ケトアシル-アシルキャリアープロテイン還元酵素をコードするDNAとNAD(P)<sup>+</sup>からNAD(P)Hを生成する活性を有する酵素をコードするDNAとを導入され、両酵素を発現する組換え微生物である、(13)に記載の方法、



- (15) 微生物が大腸菌である、(14)に記載の方法、
- (16)  $\text{NAD(P)}^+$  から  $\text{NAD(P)H}$  を生成する活性を有する酵素がグルコース脱水素酵素である、(13) から (15) のいずれかに記載の方法、
- (17) ポリ- $\beta$ -ヒドロキシ脂肪酸生合成系を構成するアセトアセチル-CoA還元酵素と  $\text{NAD(P)}^+$  から  $\text{NAD(P)H}$  を生成する活性を有する酵素とを生産する微生物を用いることを特徴とする、(7)に記載の方法、
- (18) 微生物が、異種または同種のポリ- $\beta$ -ヒドロキシ脂肪酸生合成系を構成するアセトアセチル-CoA還元酵素をコードするDNAと  $\text{NAD(P)}^+$  から  $\text{NAD(P)H}$  を生成する活性を有する酵素をコードするDNAとを導入され、両酵素を発現した組換え微生物である、(17)に記載の方法、
- (19) 微生物が大腸菌である、(18)に記載の方法、
- (20)  $\text{NAD(P)}^+$  から  $\text{NAD(P)H}$  を生成する活性を有する酵素がグルコース脱水素酵素である、(17) から (19) のいずれかに記載の方法、に関する。

【0016】

【発明の実施の形態】

本発明の(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルの生産方法においては、II型の脂肪酸合成酵素を構成する酵素(E.C 1.1.1.100)、またはPHA生合成系を構成するアセトアセチル-CoA還元酵素 (E.C 1.1.1.36)を用いることを特徴とする。II型の脂肪酸合成酵素を構成する酵素(E.C 1.1.1.100)は、 $\alpha$ サブユニットのホモ二量体が脂肪酸合成酵素の多様な活性全てを有するIA型、 $\alpha$ -サブユニットと $\beta$ -サブユニットの $\alpha_6\beta_6$ 構造が脂肪酸合成酵素の多様な活性全てを有するIB型、 $\alpha$ -サブユニットの $\alpha_6$ 構造が脂肪酸合成酵素の多様な活性全てを有するIC型に比して、構造並びに機能が単純で、分子量も小さく(サブユニットの分子量が20,000-40,000程度)、SH試薬で阻害されないという特徴を有する。このため、(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルの高濃度蓄積や遺伝子組換え技術を利用した(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステル高生産株の造成に有利であり好ましい。

【0017】

用いる酵素の由来に特に制限はない。大腸菌由来の $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵

素（配列番号：1、J. Biol. Chem. 267, 5751-5754(1992)）、枯草菌由来の $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素（配列番号：5、J. Bacteriol. 178, 4794-4800(1996)）の他、他の種々の生物由来の酵素を用いることも可能である。他の生物由来の酵素としては、例えば、アクチノバチルス・アクチノミセテムコミタンス(*Actinobacillus actinomycetemcomitans*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 230, 220-225(1997))、バチルス・ズブチルス (*Bacillus subtilis*, J. Bacteriol. 178, 4794-4800(1996))、エシェリヒア・コリ(*Escherichia coli*, J. Biol. Chem. 267, 5751-5754(1992))、ミコバクテリウム・ボビス (*Mycobacterium bovis*, Science 263, 227-230(1994))、ミコバクテリウム・スメグマティス (*Mycobacterium smegmatis*, DDBJ Accession number U66800)、ミコバクテリウム・ツベルクロシス (*Mycobacterium tuberculosis*, Mol. Microbiol. 15, 1009-1015(1995))、プロピオニバクテリウム・シャーマニー(*Propionibacterium shermanii*, J. Gen. Microbiol. 127, 121-129(1981))、ストレプトコッカス・プノイモニエ (*Streptococcus pneumoniae*, W097/43303)、シネコシステイス属 (*Synechocystis* sp., DNA Res. 3, 109-136(1996))、サーモトガ・マリティマ (*Thermotoga maritima*, J. Bacteriol. 178, 248-257(1996))、ビブリオ・ハーベイ (*Vibrio harveyi*, J. Bacteriol. 178, 571-573(1996))、ヘモフィラス・インフルエンザ (*Haemophilus influenza*, Science 269, 496-512(1995)) など由来の $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素が挙げられる。また、植物由来の $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素としては、ネギ (*Allium porrum*, Plant Physiol. 115, 501-510(1997))、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*, Biochem. J. 283, 321-326(1992)、Plant Physiol. 115, 501-510(1997))、セイヨウアブラナ(*Brassica napus*, W096/02652)、サフラワー (*Carthamus tinctorius*, Arch. Biochem. Biophys. 217, 144-154(1982))、クフィア・ランシオレータ (*Cuphea lanceolata*, Mol. Gen. Genet., 233, 122-128(1992))、大麦 (*Hordeum vulgare*, Plant Physiol. 115, 501-510(1997))、アボカド(*Persea americana*, Biochem. J., 271, 713-720(1990))、人参 (carrot, Arch. Biochem. Biophys., 300, 157-163(1993))、ユーグレナ・グラシリス (*Euglena gracilis*, J. Biol. Chem., 255, 1504-1508(1980))、ハウレンソウ(*Spinacia oleracea*, Plant Physiol., 69, 1257-1262(1982))



、トウモロコシ(*Zea mays* L., *Plant Physiol.*, 115, 501-510(1997))由来の $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素などが挙げられる。

## 【 0 0 1 8 】

$\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素をコードする遺伝子は、例えば、ハイブリダイゼーション技術を利用して単離することが可能である。例えば、大腸菌由来の $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素をコードするDNA（配列番号：2）や枯草菌由来の $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素をコードするDNA（配列番号：6）またはその一部をプローブとして他の生物から調製したDNAに対しストリンジントな条件下でハイブリダイゼーションを行うことにより、種々の生物由来の $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素を単離することが可能である。また、ポリメラーゼ連鎖反応を利用して単離することも可能である。例えば、 $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素をコードする遺伝子の中でホモロジーの高い領域(NADPH結合領域、大腸菌由来の $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素の10位から34位のアミノ酸など)からプライマーをデザインし、ポリメラーゼ連鎖反応により、特定の生物の染色体DNAまたはcDNAを鋳型として、 $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素をコードする遺伝子を種々の生物から単離することも可能である。

## 【 0 0 1 9 】

ポリ- $\beta$ -ヒドロキシ脂肪酸(PHA)は、水素細菌(アルカリゲネス(*Alcaligenes*)属)、藍藻(*Aphanothece*)、窒素固定菌(*Azotobacter*)、バチルス属(*Bacillus*)、シュードモナス属(*Pseudomonas*)、光合成細菌(*Rhodospirillum*)、放線菌など100種以上の原核微生物が蓄積することが知られている。その生合成系は、3-ケトチオラーゼ(3-ketothiolase)、アセトアセチル-CoA還元酵素(acetoacetyl-CoA reductase)、ポリ- $\beta$ -ヒドロキシ脂肪酸合成酵素(PHA synthase)から構成されている。その中で、アセトアセチル-CoA還元酵素は、分子量が2万~4万のサブユニット4量体からなり、還元反応の補酵素として還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリニン酸(NADPH)を好ましくは利用しているが、補酵素としては、より安価で安定性の高い還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NADH)も利用できるため、工業的に有利である。

## 【 0 0 2 0 】

本発明に使用するアセトアセチル-CoA還元酵素は、PHA生合成系に關与するアセトアセチル-CoA還元酵素であれば、その起源を問わず使用することができる。例えば、アシネトバクター・エスピーRA3849 (*Acinetobacter* sp.) 由来のアセトアセチル-CoA還元酵素 (*J. Bacteriol.* 177, 4501-4507 (1995)、*J. Bacteriol.*, 177, 4501-4507 (1995))、ラルストニア・ユートロファ (*Ralstonia eutropha*、旧名アルカリゲネス・ユートロファス (*Alcaligenes eutrophus*) )由来のアセトアセチル-CoA還元酵素 (*FEMS Microbiol. Lett.*, 52, 259-264 (1988))、アルカリゲネス・レータス (*Alcaligenes latus*) 由来のアセトアセチル-CoA還元酵素 (*J. Microbiol. Biotechnol.*, 6, 425-431 (1996))、アルカリゲネス・エスピーSH-69 (*Alcaligenes* sp. ) 由来のアセトアセチル-CoA還元酵素 (DDB J Accession No. AF002014)、アゾスピリラム・ブラシレンス (*Azospirillum brasilense*) 由来のアセトアセチル-CoA還元酵素 (*J. Gen. Microbiol.*, 136, 1191-1196 (1990)、*Mol. Gen. Genet.* 231, 375-384 (1992))、アゾトバクター・バイジェリンキー (*Azotobacter beijerinckii*) 由来のアセトアセチル-CoA還元酵素 (*Biochem. J.*, 134, 225-238 (1973))、バチルス・メガテリウム (*Bacillus megaterium*) 由来のアセトアセチル-CoA還元酵素 (*Can. J. Microbiol.*, 41(Suppl. 1), 77-79 (1995))、クロマチウム・ビノーサムD株 (*Chromatium vinosum*) 由来のアセトアセチル-CoA還元酵素 (*Eur. J. Biochem.*, 209, 135-150 (1992))、エクトチオロドスピラ・シャポシュニコビー (*Ectothiorhodospira shaposhnikovii*) 由来のアセトアセチル-CoA還元酵素 (*Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 40, 292-300 (1993))、ルピナス・ルテウス (*Lupinus luteus*) 由来のアセトアセチル-CoA還元酵素 (*Plant Soil*, 56, 379-390 (1980))、メチロバクテリウム・エクストークエンス (*Methylobacterium extorquens*) 由来のアセトアセチル-CoA還元酵素 (*FEMS Microbiol. Lett.*, 156, 275-279 (1997))、メチロバクテリウム・ロデシアナム MB 126 (*Methylobacterium rhodesianum*) 由来のアセトアセチル-CoA還元酵素 (*Arch. Microbiol.*, 161, 277-280 (1994))、パラコッカス・デニトリフィカンス (*Paracoccus denitrificans*) 由来のアセトアセチル-CoA還元酵素 (*FEMS Microbiol. Rev.*, 103, 257-264 (1992)、*FEMS Microbiol. Lett.* 133, 85-90 (1995))、シュードモナス・エスピー (*Pseudomonas* s

p.) 由来のアセトアセチル-CoA還元酵素 (DDBJ Accession No. Z80156)、リゾビウム・ルピニ (*Rhizobium lupini*) 由来のアセトアセチル-CoA還元酵素 (Fiziol. Rast. (Moscow), 27, 544-550 (1980))、リゾビウム・メリロティ 41 (*Rhizobium meliloti* または、シノリゾビウム・メリロティ *Sinorhizobium meliloti*) 由来のアセトアセチル-CoA還元酵素 (Microbiology, 141, 2553-2559 (1995))、ロドコッカス・ルーバー NCIMB 40126 (*Rhodococcus ruber*) 由来のアセトアセチル-CoA還元酵素 (FEMS Microbiol. Rev., 103, 93-101 (1992))、シネココッカス・エスピー (*Synechococcus* sp.) 由来のアセトアセチル-CoA還元酵素 (特開平08-187085)、シントロフォモナス・ウォルフェイ・サブスピーシーズ・ウォルフェイ (*Syntrophomonas wolfei* subsp. *wolfei*) 由来のアセトアセチル-CoA還元酵素 (Arch. Microbiol., 159, 16-20 (1993))、チオカプサ・フェニギー (*Thiocapsa pfennigii*) 由来のアセトアセチル-CoA還元酵素 (Appl. Microbiol. Biotechnol., 40, 292-300 (1993))、ズーグロエア・ラミゲラ I-16-M (*Zoogloea ramigera*) 由来のアセトアセチル-CoA還元酵素 (Arch. Microbiol., 114, 211-217 (1977)、J. Biol. Chem. 262, 97-102 (1987)) などが挙げられる。

#### 【 0 0 2 1 】

アセトアセチル-CoA還元酵素をコードする遺伝子は、その塩基配列が報告されている場合には、アミノ酸配列をコードする部分をポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を用いて単離することができる。また、例えばラルストニア・ユートロファ由来のアセトアセチル-CoA還元酵素をコードする DNA (配列番号：10；該酵素のアミノ酸配列は配列番号：9 に示した) またはその一部をプローブとして他の生物から調製した DNA に対し、ストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションを行うことにより、種々の生物由来のアセトアセチル-CoA還元酵素遺伝子を単離することが可能である。さらに、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を利用し、例えば、アセトアセチル-CoA還元酵素をコードする遺伝子の中でホモロジーの高い領域 (NADPH 結合領域など) からプライマーをデザインし、特定の生物の染色体 DNA または cDNA を鋳型として、アセトアセチル-CoA還元酵素をコードする遺伝子を種々の生物から単離することも可能である。

## 【0022】

本発明の方法においては、天然型の酵素のみならず、天然型の酵素と同等の活性を有する限り、天然型酵素のアミノ酸配列に対してアミノ酸の変異した酵素を用いることも可能である。タンパク質中のアミノ酸に変異を導入してタンパク質の改変を行う方法としては、例えば、BAL31エキソヌクラーゼIIIを用いる方法、Kunkel法、PCRを用いる方法（ラボマニュアル遺伝子工学第3版p219-p230、丸善株式会社）が当業者によく知られている。また、アミノ酸の変異は自然界において生じることもあり、人工的にアミノ酸を変異した酵素のみならず、自然界においてアミノ酸が変異した酵素も本発明の方法において用いることが可能である。

## 【0023】

また、本発明の方法においては、 $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素またはアセトアセチル-CoA還元酵素にホモロジーを有し、脂肪酸合成やPHB合成と同様な機構で生合成される各種ポリケチド類のII型合成酵素をコードする遺伝子（サッカロポリスポラ・ヒルスタ (*Saccharopolyspora hirsuta*) 由来actI遺伝子のオープンリーディングフレーム (ORF) -3遺伝子(Mol. Gen. Genet., 240, 146-150 (1993))、ストレプトマイセス・シンナモネンシス (*Streptomyces cinnamonensis*) 由来の前記actIにホモロジーを有し、モネンシン (monensin) の生合成に関与すると思われる遺伝子内のORF-5 (Mol. Gen. Genet. 234, 254-264(1992))、ストレプトマイセス・コエリカラー (*Streptomyces coelicolor*) 由来アクチノロジン (actinorhodin) 生合成遺伝子actIII遺伝子 (Gene 74, 305-320(1988))、ストレプトマイセス・ガリラエウス (*Streptomyces galilaeus*) 由来アクラビノン (Aklavinone) 生合成遺伝子aknA(J. Bacteriol. 176, 2473-2475 (1994))、ストレプトマイセス・エスピー (*Streptomyces* sp. C5) 由来ダウノマイシン (daunomycin) 生合成遺伝子dauB (J. Bacteriol. 176, 6270-6280 (1994))、ストレプトマイセス・ビオラセオルーパー (*Streptomyces violaceoruber* Tu22) 由来グラナチシン・ポリケチド合成酵素1 (Granaticin polyketide synthase putative ketoacyl reductase 1) のORF-5、同合成酵素2のORF-6 (EMBO J. 8, 2717-2725 (1989)など) や結節形成(nodulation)に関与する遺伝子（リゾビウム・メリロテ

イ (*Rhizobium meliloti*) RCR2011由来nodG遺伝子 (Nucleic Acids Res. 14, 7453-7472 (1986))、異質細胞(heterocyst)形成に関与する遺伝子 (アナバエナ・エスピー (*Anabaena* sp. (PCC 7120)) 由来 hetN遺伝子 (J. BACTERIOL. 176, 2282-2292 (1994)) など、その産物である酵素( $\beta$ -ケトアシル還元酵素など)が、4-ハロアセト酢酸エステルを還元し、(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステル生成活性を有する限り、好適に利用することができる。

【 0 0 2 4 】

本発明において「 $\beta$ -ケトアシル-アシルキャリアープロテイン還元酵素またはアセトアセチル-CoA還元酵素を用い、4-ハロ-アセト酢酸エステルまたはその誘導体を不斉還元する」とは、精製酵素を用いて還元反応を行う場合に限定されず、本酵素を含む微生物菌体、植物、または、その処理物を用いる場合も含まれる。本発明の方法においては、特に、 $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素またはアセトアセチル-CoA還元酵素をコードする遺伝子を遺伝子組換え技術を用いて同種または異種の宿主中で高発現させた生物、またはその処理物を用いることが好ましい。なお、 $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素またはアセトアセチル-CoA還元酵素を有する生物が、4-ハロアセト酢酸エステルまたはその誘導体を還元し、(R)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルを合成する酵素を併せ持つ場合には、これら(R)体を生成する酵素を自然変異、人工変異、遺伝子組換え技術などを利用して欠損させた欠損株を利用することが好ましい。

【 0 0 2 5 】

本発明において $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素遺伝子またはアセトアセチル-CoA還元酵素遺伝子を発現させるために、形質転換の対象となる宿主微生物は、 $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素活性またはアセトアセチル-CoA還元酵素活性を有するポリペプチドをコードするDNAにより形質転換され、これらの酵素活性を発現することができる微生物であれば特に制限はなく、具体的には、エシェリヒア(*Escherichia*)属、バチルス(*Bacillus*)属、シュードモナス(*Pseudomonas*)属、セラチア(*Serratia*)属、ブレヴィバクテリウム(*Brevibacterium*)属、コリネバクテリイウム(*Corynebacterium*)属、ストレプトコッカス(*Streptococcus*)属、ラクトバチルス(*Lactobacillus*)属など宿主ベクター系の開発されている細菌、サッカロマイセス

(*Saccharomyces*)属、クライベロマイセス(*Kluyveromyces*)属、シゾサッカロマイセス(*Schizosaccharomyces*)属、チゴサッカロマイセス属(*Zygosaccharomyces*)、ヤロウイア(*Yarrowia*)属、トリコスポロン(*Trichosporon*)属、ロドスポリジウム(*Rhodospiridium*)属、ハンゼヌラ(*Hansenula*)属、ピキア(*Pichia*)属、キャンディダ(*Candida*)属などの酵母、ノイロスポラ(*Neurospora*)属、アスペルギルス(*Aspergillus*)、セファロスפורウム(*Cephalosporium*)属、トリコデルマ(*Trichoderma*)属などに属するカビなどが含まれる。

【 0 0 2 6 】

形質転換体の作製のための手順および方法は、分子生物学、生物工学、遺伝子工学の分野において慣用されている技術に準じて行うことができる（例えば、Sambrookら、モレキュラー・クローニング、Cold Spring Harbor Laboratories）。微生物中などにおいて、本発明の $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素遺伝子またはアセトアセチル-CoA還元酵素遺伝子を発現させるためには、まず微生物中において安定に存在するプラスミドベクターやファージベクター中にこの遺伝子を導入し、その遺伝情報を転写・翻訳させる必要がある。そのためには、転写・翻訳を制御するユニットにあたるプロモーターを本発明のDNAの5'側上流に、ターミネーターを3'側下流に、それぞれ組み込めばよい。このプロモーター、ターミネーターとしては、宿主として利用する微生物中において機能することが知られているプロモーター、ターミネーターを用いることができる。これら各種微生物において利用可能なベクター、プロモーター、ターミネーターなどに関して「微生物学基礎講座 8 遺伝子工学・共立出版」、特に酵母に関しては、Adv. Biochem. Eng. 4 3, 75-102(1990), Yeast 8, 423-488(1992)などに詳細に記述されている。

【 0 0 2 7 】

例えば、エシェリヒア属、特に大腸菌(*Escherichia coli*)においては、プラスミドベクターとして、pBR, pUC系プラスミドを利用でき、lac( $\beta$ -ガラクトシダーゼ), trp(トリプトファンオペロン), tac(lac, trpの融合),  $\lambda$ ファージPL, PRなどに由来するプロモーターなどが利用できる。また、ターミネーターとしては、trpA由来、ファージ由来rrnBリボソーマルターミネーターなどを用いることができる。



【 0 0 2 8 】

バチルス属においては、ベクターとしてpUB110系プラスミド、pC194系プラスミドなどが利用可能であり、染色体にインテグレートすることもできる。また、プロモーター、ターミネーターとしてapr(アルカリプロテアーゼ),npr(中性プロテアーゼ),amy( $\alpha$ -アミラーゼ)などが利用できる。

【 0 0 2 9 】

シュードモナス属においては、シュードモナス・プチダ(*Pseudomonas putida*)、シュードモナス・セパシア(*Pseudomonas cepacia*)などで宿主ベクター系が開発されており、トルエン化合物の分解に関与するプラスミドTOLプラスミドを基本にした広宿主域ベクター(RSF1010などに由来する自律的複製に必要な遺伝子を含む) pKT240などが利用可能であり、プロモーター、ターミネーターとして、リパーゼ(特開平5-284973) 遺伝子などが利用できる。

【 0 0 3 0 】

ブレビバクテリウム属、特に、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム(*Brevibacterium lactofermentum*)においては、pAJ43(Gene 39, 281 (1985))などのプラスミドベクターが利用可能であり、プロモーター、ターミネーターとしては、大腸菌で使用されているプロモーター、ターミネーターがそのまま利用可能である。

【 0 0 3 1 】

コリネバクテリウム属、特に、コリネバクテリウム・グルタミカム(*Corynebacterium glutamicum*)においては、pCS11(特開昭57-183799),pCB101(Mol. Gen. Genet. 196, 175 (1984))などのプラスミドベクターが利用可能である。

【 0 0 3 2 】

ストレプトコッカス(*Streptococcus*)属においては、pHV1301 ((FEMS Microbiol. Lett. 26, 239(1985)) ,pGK1 (Appl. Environ. Microbiol. 50, 94(1985)) などがプラスミドベクターとして利用可能である。

【 0 0 3 3 】

ラクトバチルス(*Lactobacillus*)属においては、ストレプトコッカス属用に開発されたpAM $\beta$ 1 (J. Bacteriol. 137, 614(1979)) などが利用可能であり、プロ

モーターとして大腸菌で利用されているものが利用可能である。

【 0 0 3 4 】

サッカロマイセス (*Saccharomyces*) 属、特にサッカロマイセス・セレビジアエ (*Saccharomyces cerevisiae*) においては、YRp系, YEp系, YCp系, YIp系プラスミドが利用可能であり、染色体内に多コピー存在するリボソームDNAとの相同組換えを利用したインテグレーションベクター (EP 537456など) は、多コピーで遺伝子を導入でき、かつ安定に遺伝子を保持できるため極めて有用である。また、ADH(アルコール脱水素酵素), GAPDH(グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素), PHO(酸性フォスファターゼ), GAL( $\beta$ -ガラクトシダーゼ), PGK(ホスホグリセレートキナーゼ), ENO(エノラーゼ)などのプロモーター、ターミネーターが利用可能である。

【 0 0 3 5 】

クライベロマイセス属、特にクライベロマイセス・ラクティス (*Kluyveromyces lactis*) においては、サッカロマイセス・セレビジアエ由来2 $\mu$ m系プラスミド, pKD1系プラスミド (J. Bacteriol. 145, 382-390(1981)), キラー活性に関与するpGK11由来プラスミド, クライベロマイセス属における自律増殖遺伝子KARS系プラスミド, リボソームDNAなどとの相同組換えにより染色体中にインテグレート可能なベクタープラスミド (EP 537456など) などが利用可能である。また、ADH, PGKなどに由来するプロモーター、ターミネーターが利用可能である。

【 0 0 3 6 】

シゾサッカロマイセス (*Schizosaccharomyces*) 属においては、シゾサッカロマイセス・ポンベ由来のARS(自律複製に関与する遺伝子)及びサッカロマイセス・セレビジアエ由来の栄養要求性を相補する選択マーカーを含むプラスミドベクターが利用可能である (Mol. Cell. Biol. 6, 80(1986))。また、シゾサッカロマイセス・ポンベ由来のADHプロモーターなどが利用できる (EMBO J. 6, 729(1987))。

【 0 0 3 7 】

チゴサッカロマイセス属 (*Zygosaccharomyces*) においては、チゴサッカロマイセス・ロウキシ (*Zygosaccharomyces rouxii*) 由来のpSB3 (Nucleic Acids Res. 1



3, 4267(1985)) などに由来するプラスミドベクターが利用可能であり、サッカロマイセス・セレビジアエ由来PH05プロモーターや、チゴサッカロマイセス・ロウキシ由来GAP-Zr(グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素)のプロモーター(Agri. Biol. Chem. 54, 2521(1990)) などが利用可能である。

【 0 0 3 8 】

ハンゼヌラ(Hansenula)属においては、ハンゼヌラ・ポリモルファ(Hansenula polymorpha)において宿主ベクター系が開発されている。ベクターとしては、ハンゼヌラ・ポリモルファ由来自律複製に関与する遺伝子(HARS1,HARS2)も利用可能であるが、比較的不安定であるため、染色体への多コピーインテグレーションが有効である(Yeast 7, 431-443(1991))。また、メタノールなどで誘導されるAOX(アルコールオキシダーゼ),FDH(ギ酸脱水素酵素)のプロモーターなどが利用可能である。

【 0 0 3 9 】

ピキア(Pichia)属においては、ピキア・パストリス(Pichia pastoris)などにピキア由来自律複製に関与する遺伝子(PARS1,PARS2)などを利用した宿主ベクター系が開発されており(Mol. Cell. Biol. 5, 3376(1985))、高濃度培養とメタノールで誘導可能なAOXなど強力なプロモーターが利用できる(Nucleic Acids Res. 15, 3859(1987))。

【 0 0 4 0 】

キャンディダ(Candida)属においては、キャンディダ・マルトーサ(Candida maltosa)、キャンディダ・アルビカンズ(Candida albicans)、キャンディダ・トロピカリス(Candida tropicalis)、キャンディダ・ウチルス(Candida utilis)などにおいて宿主ベクター系が開発されている。キャンディダ・マルトーサにおいてはキャンディダ・マルトーサ由来ARSがクローニングされ(Agri. Biol. Chem. 51, 1587(1987))、これを利用したベクターが開発されている。また、キャンディダ・ウチルスにおいては、染色体インテグレートタイプのベクターは強力なプロモーターが開発されている(特開平8-173170号公報)。

【 0 0 4 1 】

アスペルギルス(Aspergillus)属においては、アスペルギルス・ニガー(Asperg

*illus niger*)、アスペルギルス・オリジー(*Aspergillus oryzae*)などがカビの中で最もよく研究されており、プラスミドや染色体へのインテグレーションが利用可能であり、菌体外プロテアーゼやアミラーゼ由来のプロモーターが利用可能である (Trends in Biotechnology 7, 283-287(1989))。

【 0 0 4 2 】

トリコデルマ(*Trichoderma*)属においては、トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)を利用した宿主ベクター系が開発され、菌体外セルラーゼ遺伝子由来プロモーターなどが利用できる (Biotechnology 7, 596-603(1989))。

【 0 0 4 3 】

形質転換体の培養、および形質転換体からの組み換えタンパク質の精製は、当業者に公知の方法により行うことができる。

【 0 0 4 4 】

本発明の方法において用いられる上記酵素の基質としては、4-ハロ-アセト酢酸エステルまたはその誘導体が用いられる。誘導体としては、例えば、 $\alpha$ 位に置換を有するものが挙げられる。基質としては、特に、4-クロロアセト酢酸エステルおよび4-クロロアセト酢酸エチルエステルが好ましい。本発明の方法において用いる基質の濃度は、通常、0.1~50%であり、好ましくは1~20%である。また、用いる酵素量は、通常、0.01~500U/ml-反応液であり、好ましくは0.1~50U/ml-反応液である。反応系には用いる酵素の要求する補酵素 (NADPHまたはNADH) を基質に対して0.00001~5当量、好ましくは0.0001~1当量を必要に応じて添加する。反応系の溶媒には、例えば、pHを維持するための緩衝液 (例えば、リン酸緩衝液) を用いることができる。また、オクタン、ヘキサン、トルエン、酢酸エチル、酢酸n-ブチル、クロロホルムなどの有機溶媒を10~90%含む水系の2相系を用いることもできる。反応温度は、通常、4~50℃、好ましくは10~30℃である。反応pHは、通常、5~9、好ましくは5.5~8.0である。反応により生成する(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルは、酢酸エチル、オクタンなどの生成物を溶解する能力の高い有機溶媒で抽出し、蒸留などの方法で精製することができる。

【 0 0 4 5 】

反応においては、適宜、還元反応に付随してNADPHから生成する $\text{NADP}^+$ を、NADPHへ再生する（PHAやポリケチドの生合成などに関与するアセトアセチル-CoA還元酵素や $\beta$ -ケトアシル還元酵素には、NADPHだけではなく、NADHも利用される）。これら補酵素の再生には、微生物の持つ $\text{NAD(P)}^+$ 還元能（解糖系など）を用いて行うことができる。これら $\text{NAD(P)}^+$ 還元能は、反応系にグルコースやエタノールを添加することにより増強させることが可能である。また、 $\text{NAD(P)}^+$ から $\text{NAD(P)H}$ を生成する能力を有する微生物、その処理物、または酵素を反応系に添加することによっても行うことができる。例えば、グルコース脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素、グルタミン酸脱水素酵素、ギ酸脱水素酵素、アルコール脱水素酵素、アミノ酸脱水素酵素、および/またはグリセロール脱水素酵素を含む微生物、その処理物、または精製酵素を用いて $\text{NAD(P)H}$ の再生を行うことができる。さらに、これら $\text{NAD(P)H}$ 再生能を有する酵素を、 $\beta$ -ケトアシル還元酵素生産能またはアセトアセチル-CoA還元酵素生産能を有する微生物中で遺伝子組換え技術を利用して高発現させた微生物またはその処理物を利用することができる。

## 【 0 0 4 6 】

本発明においては、アセトアセチル-CoA還元酵素と $\text{NAD(P)H}$ 再生能を有する酵素の双方または $\beta$ -ケトアシル還元酵素と $\text{NAD(P)H}$ 再生能を有する酵素の双方の生産能を有する微生物またはその処理物を利用することもできる。また、これら酵素を遺伝子組換え技術を利用して高発現させた微生物またはその処理物を利用することもできる。

## 【 0 0 4 7 】

アセトアセチル-CoA還元酵素もしくは $\beta$ -ケトアシル還元酵素と、 $\text{NAD(P)H}$ 再生能を有する酵素の双方の生産能を有する微生物またはその処理物を用いて 4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルを製造する方法においては、反応液の容量に対して1/50～20容量、好ましくは、1/10～5容量の培養液、培養液から得られた微生物菌体、もしくはその処理物を用いることができる。反応液には必要に応じて、 $\text{NAD}^+$ もしくは $\text{NADP}^+$ を、例えば、基質に対して0.00001～5等量、好ましくは、0.001～1等量添加することができる。

## 【 0 0 4 8 】

さらに、双方の酵素を生産する微生物、もしくはその処理物を  $\kappa$ -カラギーナン、アクリルアミド、ポリウレタン、キチンなどを利用して固定化したバイオリアクターを用いることも可能である。バイオリアクターを用いた反応は、基質 4-ハロアセト酢酸エステル、補酵素再生用の基質（たとえば、グルコース脱水素酵素を補酵素再生用の酵素として利用する場合には、グルコース）、さらに、必要に応じて pH コントロール用の緩衝液、補酵素  $\text{NAD}^+$  もしくは  $\text{NADP}^+$  を連続的に供給する方法や、繰り返し回分反応により行うことができる。

## 【 0 0 4 9 】

## 【実施例】

以下、実施例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

## 【 0 0 5 0 】

【実施例 1】 大腸菌の  $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素遺伝子の取得

大腸菌 (*Escherichia coli*) JM109株をLB培地 (Bacto-Tryptone 10g, Bacto-Yeast extract 5 g, NaCl 10 g/L) で培養し、得られた菌体より Qiagen Genomic-tip (Qiagen社製) を用いて、染色体DNAを調製した。大腸菌の  $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素遺伝子 (*fabG*) (J. Biol. Chem. 267, 5751-5754(1992)) をPCRクローニングするために、構造遺伝子の5'末端、3'末端の配列を基に、プライマー ECR-ATG1 (5'-AAAGGATCCAACAATGAATTTTGAAGGAAAAATCGC-3'、配列番号：3) 及び ECR-TAG1 (5'-TGCCTCGAGTTATCAGACCATGTACATCCCGC-3'、配列番号：4) を合成した。大腸菌の染色体DNAを鋳型とし、ECR-ATG1, ECR-TAG1をプライマーとして、PCR (95℃, 30秒、50℃, 1分、75℃, 2分) を30サイクル行い、特異的な増幅サンプルを得た。

## 【 0 0 5 1 】

得られたDNA断片をBamHI, XhoIの2種類の制限酵素で2重消化した。プラスミドベクター pSE420 (Invitrogen社製) をNcoI, BamHIで二重消化し、クレノウ断片処理後、自己環化反応を行い、pSE420Bを得た。pSE420BをBamHI, XhoIで2重消化し、同じ制限酵素で2重消化したPCR増幅断片とT4DNAリガーゼにより連結し、pSE-ECR1を得た。得られたプラスミド中の挿入断片は塩基配列を解析し、*fabG*遺伝子であることを確認した。なお、*fabG*遺伝子の塩基配列を配列番号：2に、該遺伝子

がコードするタンパク質のアミノ酸配列を配列番号：1に示す。

【0052】

【実施例2】 大腸菌の $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素遺伝子の発現

pSE-ECR1で形質転換した大腸菌HB101株 (E.coli HB101 (pSE-ECR1))をアンピシリン50 mg/Lを含むLB培地5mLで終夜培養後、IPTGを0.1 mM添加し、さらに5時間培養した。得られた菌体を集菌後、ミニビートビーター8 (BIOSPEC社製)で破碎し、遠心分離した上清を無細胞抽出液とした。

【0053】

【実施例3】 大腸菌由来の $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素の還元活性

実施例2で得られた無細胞抽出液を用い、4-クロロアセト酢酸エチル、アセト酢酸エチル、アセトアセチル-コエンザイムAを基質とした還元活性を測定した。

【0054】

還元活性の測定は、50 mMリン酸カリウム緩衝液(pH 6.5)、0.2 mM NADPH、20 mM 4-クロロアセト酢酸エチル(アセト酢酸エチル還元活性の測定の場合には20 mMアセト酢酸エチル、アセトアセチルコエンザイムA還元活性の測定の場合には0.2 mMアセトアセチルコエンザイムA)及び酵素を含む反応液中で、25℃で反応させた。1Uは、1分間に1  $\mu$ molのNADPHの減少を触媒する酵素量とした。測定結果を表1に示した。なお、表中の「ECAA」は4-クロロアセト酢酸エチルエステルを、「EAA」はアセト酢酸エチルエステルを、「AASCoA」はアセトアセチル-コエンザイムAを示す。また、「R」は還元活性、「DH」は脱水素酵素活性を示す。

【0055】

【表1】

	NADPH ECAA-R	NADPH- AASCoA-R	NADPH- EAA-R	NADP <sup>+</sup> -R- ECHB-DH	NADP <sup>+</sup> -S- ECHB-DH
無細胞抽出液	100%	116%	1.90%	0.010%	0.004%

【0056】

$\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素を発現させた無細胞抽出液では、NADPH依存的に4-

クロロアセト酢酸エチルエステル還元活性を示し、その比活性は、0.90 U/mg-蛋白質であった。なお、プラスミドpSE-ECR1を含まないHB101株のみでは同様に培養した菌体でほとんど4-クロロアセト酢酸エチルエステル還元活性を示さなかった。

## 【0057】

アセトアセチル-コエンザイムAに対する活性は、4-クロロアセト酢酸エチルエステル還元活性と同程度であったが、クロロ基を有しないアセト酢酸エチルに対してはほとんど活性を示さなかった。

## 【0058】

〔実施例4〕 大腸菌由来の $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素の酸化活性

実施例2で得られた無細胞抽出液を用い、(S)または(R)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルエステルに対する酸化活性を測定した。酸化活性の測定は、50 mM トリス塩酸緩衝液(pH 9.0)、2.5 mM  $\text{NADP}^+$ 、20 mM 4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチル及び酵素を含む反応液中で、25℃で反応させた。1Uは、1分間に1  $\mu\text{mol}$ のNADPHの増加を触媒する酵素量とした。反応結果を表1に示す。表1に示したように、いずれの基質に対してもほとんど酸化活性を示さなかった。なお、表中の「ECHB」は4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルエステルを示す。

## 【0059】

〔実施例5〕 大腸菌由来の $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素の4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルに対する立体選択性

200 mMリン酸カリウム緩衝液(pH 6.5)、146 mM NADPH、2% 4-クロロアセト酢酸エチル (122 mM)及び実施例2で調製した $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素2Uを含む1 mLの反応液を用い、20℃で1晩反応させた。

## 【0060】

反応液の一部を0.1 N塩酸で2倍希釈し、ガスクロマトグラフィーにより生成した4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルエステルを定量した。ガスクロマトグラフィーは、サーモン3000クロモソルブW(2 m、信和化工社製)、カラム温度150℃、検出温度250℃の条件で、水素炎イオン化検出器(FID)により行った。その結果、4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルエステル濃度は13.3 g/Lであり、収率は66.3%



であった。

#### 【 0 0 6 1 】

光学純度の測定は、反応液から4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルを酢酸エチルで抽出し、脱溶媒した後、光学分割カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー(カラム,ダイセル化学製キラルセルOD;移動相,n-ヘキサン/イソプロパノール(9/2);RI検出;流速,0.5 mL/分)により測定した。その結果、光学純度は96.5% ee (S)以上であった。

#### 【 0 0 6 2 】

[実施例 6] 大腸菌由来の $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素による4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルエステルの合成

200 mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 6.5)、2% 4-クロロアセト酢酸エチルエステル (122 mM)、1.0mM NADPH、 $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素1 U、250mM グルコース、10 U グルコース脱水粗酵素 (和光純薬社製) を含む1 mLの反応液を用い、25℃で16時間反応させた。分析を実施例 5 の方法により行った結果、98.4%の収率で、95.4% ee (S)以上の4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルエステルが合成された。

#### 【 0 0 6 3 】

[実施例 7] 枯草菌の $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素遺伝子の取得

枯草菌(*Bacillus subtilis* BGSC 1A1株)をLB培地 (Bacto-Tryptone 10g, Bacto-Yeast extract 5 g, NaCl 10 g/L)で培養し、得られた菌体よりQiagen Genomic-tip(Qiagen社製)を用いて、染色体DNAを調製した。枯草菌の $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素遺伝子 (fabG)をPCRクローニングするために、構造遺伝子の5'-末、3'-末の配列を元にプライマーBSR-ATG1 (5'-GGACCATGGATATGCTTAATGATAAAACGGCTA-3'、配列番号: 7)及びBSR-TAA1 (5'-GAGAAGCTTCTCGAGTTACATCACCATTCCGCCG-3'、配列番号: 8)を合成した。枯草菌の染色体DNAを鋳型とし、BSR-ATG1,BSR-TAA1をプライマーとして、PCR(95℃,30秒、50℃,1分、75℃,2分)を30サイクル行い、特異的な増幅サンプルを得た。

#### 【 0 0 6 4 】

得られたDNA断片をNcoI,HindIIIの2種類の制限酵素で2重消化した。プラスミ

ドベクターpSE420(Invitrogen製)をNcoI,HindIIIで二重消化し、同じ制限酵素で2重消化したPCR増幅断片とT4DNAリガーゼにより連結し、pSE-BSR1を得た。得られたプラスミド中の挿入断片は塩基配列を解析し、fabG遺伝子であることを確認したが、以下の1カ所のみアミノ酸置換が見られた。データベース (DDBJ(DNA Data Bank of Japan,)Accession No. U59433) 記載の25位Alaに相当するGCTがGATに置換しており、25位はAspであった。なお、得られたfabG遺伝子の塩基配列を配列番号：6に、該遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列を配列番号：5に示す。

## 【 0 0 6 5 】

【実施例 8】 枯草菌の $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素遺伝子の発現

pSE-BSR1で形質転換した大腸菌HB101株 (E.coli HB101(pSE-BSR1))をアンピシリン50 mg/Lを含むLB培地7 mLで終夜培養後、IPTGを0.1 mM添加し、さらに5時間培養した。得られた菌体を集菌後、ミニビートビーター8(BIOSPEC社製)で破碎し、遠心分離した上清を無細胞抽出液とした。

## 【 0 0 6 6 】

【実施例 9】 枯草菌由来 $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素の還元活性

実施例8で得られた無細胞抽出液を用い、4-クロロアセト酢酸エチル、アセトアセチル-コエンザイムAを基質とした還元活性を、実施例3に記載の方法により測定した。測定結果を表2に示した。なお、表中の「ECAA」は4-クロロアセト酢酸エチルエステルを、「AASCoA」はアセトアセチル-コエンザイムAを示す。

## 【 0 0 6 7 】

【表 2】

基質 コエンザイム	ECAA		AASCoA	S-ECHB	R-ECHB
	NADPH	NADH	NADPH	NADP <sup>+</sup>	NADP <sup>+</sup>
U/mg 相対活性	0.133 100%	0 0.0%	0.030 22,3%	0.002 1.3%	0.002 1.3%

## 【 0 0 6 8 】



$\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素を発現させた無細胞抽出液では、NADPH依存的に4-クロロアセト酢酸エチルエステル還元活性を示し、その比活性は、0.133 U/mg-蛋白質であった。なお、プラスミドpSE-BSR1を含まないHB101株のみでは同様に培養した菌体でほとんど4-クロロアセト酢酸エチルエステル還元活性を示さなかった。アセトアセチル-CoAに対する活性は、4-クロロアセト酢酸エチルエステル還元活性の22%程度と低く、大腸菌由来の酵素との差異が見られた。

## 【0069】

[実施例10] 枯草菌由来 $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素の酸化活性

実施例8で得られた無細胞抽出液を用い、(S)または(R)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルエステルに対する酸化活性を測定した。酸化活性の測定は、実施例4に記載の方法により行った。反応結果を表2に示したが、いずれの基質に対してもほとんど酸化活性を示さなかった。なお、表中の「ECHB」は4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルエステルを示す。

## 【0070】

[実施例11] 枯草菌由来 $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素の立体選択性

200 mMリン酸カリウム緩衝液(pH 6.5)、1 mM  $\text{NADP}^+$ 、2% 4-クロロアセト酢酸エチル (122 mM)及び実施例8で調製した $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素0.8 U、250 mM グルコース、3.2 Uグルコース脱水素酵素（和光純薬社製）を含む1 mLの反応液を用い、25℃で1日反応させた。分析を実施例5の方法により行った結果、定量的に、98.1% ee (S) 以上の4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルが合成された。

## 【0071】

## [実施例12] ラルストニア・ユートロファのアセトアセチル-CoA還元酵素遺伝子の取得

ラルストニア・ユートロファ (*Ralstonia eutropha* DSM 531) をブイヨン培地 (肉エキス 5.0 g、ペプトン 15.0 g、NaCl 5.0 g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  5.0 g / 1 L) で培養し、得られた菌体よりQiagen Genomic-tip (Qiagen社製) を用いて、染色体DNAを調製した。

【 0 0 7 2 】

ラルストニア・ユートロファのアセトアセチル-CoA還元酵素遺伝子 (phbB) を PCRクローニングするために、構造遺伝子の5'-末、3'-末の配列を元にプライマー AER-ATG1: (5' - AGTGGATCCAATGACTCAGCGCATTGCGTA-3'、配列番号: 1 1) 及びAER-TAA1 (5' - AACAAAGCTTCTCGAGTTAGCCCATATGCAGGCCGC-3'、配列番号: 1 2) を合成した。

【 0 0 7 3 】

ラルストニア・ユートロファの染色体DNAを鋳型とし、AER-ATG1, AER-TAA1をプライマーとして、PCR (95℃, 30秒、50℃, 1分、75℃, 2分) 30サイクル行い、特異的な増幅サンプルを得た。

【 0 0 7 4 】

得られたDNA断片をBamHI, HindIIIの2種類の制限酵素で2重消化した。実施例 1の方法により調製したプラスミドベクターpSE420B をBamHI, HindIIIで二重消化し、同じ制限酵素で2重消化したPCR増幅断片とT4DNAリガーゼにより連結し、pSE-AER1を得た。

【 0 0 7 5 】

得られたプラスミド中の挿入断片は塩基配列を解析し、phbB遺伝子であることを確認した (配列番号: 9、1 0)。

【 0 0 7 6 】

【実施例 1 3】 ラルストニア・ユートロファのアセトアセチル-CoA還元酵素遺伝子の発現プラスミド pSE-AER1で形質転換した大腸菌 HB101株 (E.coli HB101 (pSE-AER1)) をアンピシリン50 mg/Lを含むLB培地7 mLで終夜培養後、IPTGを0.1 mM添加し、さらに5時間培養した。

【 0 0 7 7 】

得られた菌体を集菌後、ミニビートビーター8 (BIOSPEC社製) で破碎し、遠心分離した上清を無細胞抽出液とした。

【 0 0 7 8 】

【実施例 1 4】 ラルストニア・ユートロファのアセトアセチル-CoA還元酵素の還元活性

実施例 1 3 で得られた無細胞抽出液を用い、4-クロロアセト酢酸エチル、アセトアセチル-CoAを基質とした還元活性を、実施例3に記載の方法により測定した。測定結果を表 3 に示した。

【 0 0 7 9 】

【表 3】

基質	AASCoA	ECAA		S-ECHB	R-ECHB
コエンザイム	NADPH	NADPH	NADH	NADP <sup>+</sup>	NADP <sup>+</sup>
U/mg	0.984	2.50	0.056	0	0
相対活性	100%	255%	5.7%	0%	0%

【 0 0 8 0 】

$\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素を発現させた無細胞抽出液では、NADPH依存的に4-クロロアセト酢酸エチルエステル還元活性を示し、その比活性は、2.50 U/mg-蛋白質であった。なお、プラスミドpSE-AER1を含まないHB101株のみでは同様に培養した菌体でほとんど4-クロロアセト酢酸エチルエステル還元活性を示さなかった。

【 0 0 8 1 】

アセトアセチル-CoAに対する活性は、4-クロロアセト酢酸エチルエステル還元活性の39%程度と低かった。

【 0 0 8 2 】

【実施例 1 5】 ラルストニア・ユートロファのアセトアセチル-CoA還元酵素の酸化活性

実施例 1 3 で得られた無細胞抽出液を用い、(S)または(R)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルエステルに対する酸化活性を測定した。酸化活性の測定は、実施例 4 に記載の方法により行った。反応結果を表 3 に示したが、いずれの基質に対してもほとんど酸化活性を示さなかった。

【 0 0 8 3 】

【実施例 1 6】 ラルストニア・ユートロファのアセトアセチル-CoA還元酵素

## の立体選択性

100 mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 6.5)、1 mM $\text{NADP}^+$ 、2% (122 mM) 4-クロロアセト酢酸エチル及び実施例 1 3 で調製した $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素1 U、243 mM グルコース、2.8 Uグルコース脱水素酵素 (和光純薬社製) を含む1 mLの反応液を用い、25℃で終夜反応させた。分析を実施例 5 の方法により行った結果、収率67%で、99% ee (S) 以上の4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルが合成された。

### 【0084】

#### 〔実施例 1 7〕 共発現用プラスミドpSE420Dの構築

実施例 1 で構築したプラスミドpSE420Bを2つの制限酵素MunI, SpeIで2重消化し、合成DNA SE420D-S (配列番号 1 3 : AATTCTCGAGTAATCTAGAGGAATTCTAAAA) と合成DNA SE420D-A (配列番号 1 4 : CTAGTTTTAGAATTCCTCTAGATTACTCGAG) をアニール後にT4 DNAリガーゼで連結し、pSE420Dを得た。pSE420Dのプラスミドマップを図 1 に示した。

### 【0085】

#### 〔実施例 1 8〕 枯草菌からのグルコース脱水素酵素遺伝子のクローニング

還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリソンの再生を行わせるために、文献 (J. Bacteriol. 166, 238-243 (1986)) 記載の枯草菌由来グルコース脱水素酵素遺伝子のクローニングを行った。

文献記載の塩基配列を元に、グルコース脱水素酵素遺伝子のオープンリーディングフレーム部分のみをPCRクローニングするため、構造遺伝子の5'-末、3'-末の配列を元にプライマーBSG-ATG1 (GAGGAATTCATACATGTATCCAGATTATAAAGGAA、配列番号: 15)、BSG-TAA2 (GGTAAGCTTTCATTAACCGCGGCCTGCCTG、配列番号: 16) を合成した。

実施例 7 により調製した枯草菌染色体DNAを鋳型として、PCR (95℃, 30秒、50℃, 1分、75℃, 3分15秒)を30サイクル行い、特異的な増幅DNAを得た。

得られたDNA断片をEcoRI, HindIIIの2種類の制限酵素で2重消化した。実施例 1 7 で構築したプラスミドベクターpSE420L をEcoRI, HindIIIで2重消化し、同酵素で2重消化したPCR増幅DNA断片をT4 DNAリガーゼで連結し、pSE-BSG1を得た。

。挿入DNA断片の塩基配列の解析を行った結果、データベース (DDBJ Accession No. M12276) に収録されている塩基配列とすべて一致した。

得られたグルコース脱水素酵素の塩基配列を配列番号：17に、該遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列を配列番号：18に示す。

【0086】

〔実施例19〕 大腸菌由来の $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素とバチルス・ズブチリス由来のグルコース脱水素酵素遺伝子を共発現するプラスミドpSG-ECR1の構築

実施例1で構築したpSE-ECR1をBamHI, XhoIの2つの制限酵素で2重消化し、大腸菌由来の $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素遺伝子を含むDNA断片を調製した。

実施例17で構築した枯草菌由来のグルコース脱水素酵素遺伝子を含むプラスミドpSE-BSG1をBamHI, XhoIの2つの制限酵素で2重消化し、pSE-ECR1より同酵素で切り出した大腸菌由来の $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素遺伝子を含むDNA断片とT4 DNAリガーゼで連結し、グルコース脱水素酵素と $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素を同時に発現可能なプラスミドpSG-ECR1を得た。プラスミドpSG-ECR1のマップを図2に示す。

【0087】

〔実施例20〕 枯草菌由来の $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素とバチルス・ズブチリス由来のグルコース脱水素酵素遺伝子を共発現するプラスミドpSG-BSR1の構築

実施例7で構築したpSE-ECR1をNcoI, XhoIの2つの制限酵素で2重消化し、枯草菌由来の $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素遺伝子を含むDNA断片を調製した。

実施例17で構築した枯草菌由来のグルコース脱水素酵素遺伝子を含むプラスミドpSE-BSG1をNcoI, XhoIの2つの制限酵素で2重消化し、pSE-BSR1より同酵素で切り出した枯草菌由来の $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素遺伝子を含むDNA断片とT4 DNAリガーゼで連結し、グルコース脱水素酵素と $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素を同時に発現可能なプラスミドpSG-BSR1を得た。プラスミドpSG-BSR1のマップを図3にしめす。

【 0 0 8 8 】

〔実施例 2 1〕 ラルストニア・ユートロファ由来のアセトアセチル-CoA還元酵素とバチルス・ズブチリス由来のグルコース脱水素酵素遺伝子を共発現するプラスミドpSG-AER1の構築

実施例 1 2 で構築したpSE-AER1をBamHI, XhoIの2つの制限酵素で2重消化し、ラルストニア・ユートロファ由来のアセトアセチル-CoA還元酵素遺伝子を含むDNA断片を調製した。

実施例 1 7 で構築した枯草菌由来のグルコース脱水素酵素遺伝子を含むプラスミドpSE-BSG1をNcoI, XhoIの2つの制限酵素で2重消化し、pSE-AER1より同酵素で切り出したラルストニア・ユートロファ由来のアセトアセチル-CoA還元酵素遺伝子を含むDNA断片とT4 DNAリガーゼで連結し、グルコース脱水素酵素とアセトアセチル-CoA還元酵素を同時に発現可能なプラスミドpSG-AER1を得た。プラスミドpSG-AER1のマッパを図 4 に示す。

【 0 0 8 9 】

〔実施例 2 2〕 枯草菌由来のグルコース脱水素酵素と大腸菌由来の $\beta$ -ケトアシルACP還元酵素、もしくは枯草菌由来の $\beta$ -ケトアシルACP還元酵素、もしくはラルストニア・ユートロファ由来のアセトアセチル-CoA還元酵素の大腸菌における同時発現

枯草菌由来のグルコース脱水素酵素と大腸菌由来の $\beta$ -ケトアシルACP還元酵素、もしくは枯草菌由来の $\beta$ -ケトアシルACP還元酵素、もしくはラルストニア・ユートロファ由来のアセトアセチル-CoA還元酵素を同時に発現するためのプラスミドpSG-ECR1, pSG-BSR1, pSG-AER1 (記載順) により大腸菌HB101株を形質転換した。

【 0 0 9 0 】

それぞれのプラスミドから得られた組換え大腸菌を2xYT培地 (Bacto-Tryptone 20 g, Bacto-Yeast extract 10 g, NaCl 10 g/L) に植菌し、30℃で終夜培養した後、IPTGを0.1 mM添加し、さらに4時間培養した。

得られた3種類の大腸菌を集菌し、酵素活性の測定および4-クロロアセト酢酸エチル還元反応に用いた。

## 【 0 0 9 1 】

【実施例 2 3】 pSG-ECR1, pSG-BSR1, pSG-AER1で形質転換した大腸菌の酵素活性

実施例 2 1 により調製したpSG-ECR1, pSG-BSR1, pSG-AER1それぞれで形質転換した大腸菌（培養液2 mL相当）を0.25 mLの菌体破碎液（100 mMリン酸カリウム緩衝液（pH 6.5）, 0.02% 2-メルカプトエタノール, 0.5 M塩化ナトリウム）に懸濁し、密閉式超音波破碎装置UCD-200TM（コスモバイオ製）を用いて3分間処理し、菌体を破碎した。菌体破碎液を遠心分離し、その上清を粗酵素液として回収し、酵素活性の測定に用いた。

4-クロロアセト酢酸エチル還元活性の測定は、実施例 3 に記載の方法により行った。

グルコース脱水素酵素活性の測定は、100 mMリン酸カリウム緩衝液（pH 6.5）、2.5 mM  $\text{NAD}^+$ 、100 mM D-グルコース及び酵素を含む反応液中で25℃でおこなった。

1 Uは、上記反応条件において1分間に 1  $\mu\text{mol}$ のNADHの生成を触媒する酵素量とした。

pSG-ECR1, pSG-BSR1, pSG-AER1を持つ各組換え大腸菌から得た粗酵素液の各酵素活性及びSECHB合成を表 4 に示した。

## 【 0 0 9 2 】

【表 4】

プラスミド	酵素活性 (U/mL-br)		SECHB 合成	
	GlcDH	ECAA-R	(g/L)	ee(%)S
pSG-ECR1	0.476	0.151	20.3	93.7
pSG-BSR1	4.089	0.203	42.3	98.0
pSG-AER1	3.717	1.475	42.8	99.3

U/mL-br: 培養液 1 mL あたりの酵素活性

GlcDH: グルコース脱水素酵素

ECAA-R: 4-クロロアセト酢酸エチル還元酵素

SECHB: (S)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチル

## 【 0 0 9 3 】

プラスミドを有しない大腸菌は、グルコース脱水素酵素、4-クロロアセト酢酸



エチル還元活性のいずれも有しないが、pSG-ECR1、pSG-BSR1、もしくはpSG-AER1を持つ大腸菌は、グルコース脱水素酵素活性、4-クロロアセト酢酸エチル還元活性両方を有し、プラスミドに導入した2種類の酵素が発現していることが確認できた。

【0094】

【実施例 2 4】 pSG-ECR1、pSG-BSR1、pSG-AER1で形質転換した大腸菌を用いた (S)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチル合成

実施例 2 1 において調製したpSG-ECR1、pSG-BSR1、pSG-AER1をそれぞれ含む大腸菌を用いて 4-クロロアセト酢酸エチル還元反応を行った。

培養液 20mL より調製した各大腸菌、200 mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 6.5)、4% 4-クロロアセト酢酸エチル、486 mM D-グルコース、1 mM NADP<sup>+</sup> を含む20mLの反応液を攪拌下に25℃で1晩反応させた。

反応液中の (S) - 4 - クロロ - 3 - ヒドロキシ酪酸エチルの定量並びに光学純度の測定は実施例 5 と同様に行ない、その結果を表 4 に示した。

いずれのプラスミドを含む大腸菌においても、効果的に (S) - 4 - クロロ - 3 - ヒドロキシ酪酸エチルが高い立体選択性を伴って合成できた。

【0095】

【発明の効果】

本発明により、II型の脂肪酸合成酵素を構成する  $\beta$ -ケトアシル-アシルキャリアープロテイン還元酵素またはポリ- $\beta$ -ヒドロキシ脂肪酸の生合成系を構成するアセトアセチル-CoA還元酵素を利用した光学活性(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルの生産方法が提供された。II型の脂肪酸合成酵素を構成する  $\beta$ -ケトアシル-アシルキャリアープロテイン還元酵素は、特に、遺伝子組換え技術を利用した高生産系の構築に有利であり、これにより効率的に光学活性(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルを製造することが可能となった。

【0096】

【配列表】

SEQUENCE LISTING



<110> DAICEL CHEMICAL INDUSTRIES,LTD.

<120> Method for producing optically active  
4-halo-3-hydroxybutyrate ester

<130> D1-003DP2

<150> JP 1998-126507

<151> 1998-05-08

<150> JP 1998-300178

<151> 1998-10-21

<160> 18

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 244

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 1

Met Asn Phe Glu Gly Lys Ile Ala Leu Val Thr Gly Ala Ser Arg Gly

1

5

10

15

Ile Gly Arg Ala Ile Ala Glu Thr Leu Ala Ala Arg Gly Ala Lys Val

20

25

30

Ile Gly Thr Ala Thr Ser Glu Asn Gly Ala Gln Ala Ile Ser Asp Tyr  
35 40 45

Leu Gly Ala Asn Gly Lys Gly Leu Met Leu Asn Val Thr Asp Pro Ala  
50 55 60

Ser Ile Glu Ser Val Leu Glu Lys Ile Arg Ala Glu Phe Gly Glu Val  
65 70 75 80

Asp Ile Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Thr Arg Asp Asn Leu Leu Met  
85 90 95

Arg Met Lys Asp Glu Glu Trp Asn Asp Ile Ile Glu Thr Asn Leu Ser  
100 105 110

Ser Val Phe Arg Leu Ser Lys Ala Val Met Arg Ala Met Met Lys Lys  
115 120 125

Arg His Gly Arg Ile Ile Thr Ile Gly Ser Val Val Gly Thr Met Gly  
130 135 140

Asn Gly Gly Gln Ala Asn Tyr Ala Ala Ala Lys Ala Gly Leu Ile Gly  
145 150 155 160

Phe Ser Lys Ser Leu Ala Arg Glu Val Ala Ser Arg Gly Ile Thr Val  
165 170 175

Asn Val Val Ala Pro Gly Phe Ile Glu Thr Asp Met Thr Arg Ala Leu  
180 185 190

Ser Asp Asp Gln Arg Ala Gly Ile Leu Ala Gln Val Pro Ala Gly Arg  
 195 200 205

Leu Gly Gly Ala Gln Glu Ile Ala Asn Ala Val Ala Phe Leu Ala Ser  
 210 215 220

Asp Glu Ala Ala Tyr Ile Thr Gly Glu Thr Leu His Val Asn Gly Gly  
 225 230 235 240

Met Tyr Met Val

<210> 2

<211> 735

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(735)

<400> 2

atg aat ttt gaa gga aaa atc gca ctg gta acc ggt gca agc cgc gga 48  
 Met Asn Phe Glu Gly Lys Ile Ala Leu Val Thr Gly Ala Ser Arg Gly  
 1 5 10 15

att ggc cgc gca att gct gaa acg ctc gca gcc cgt ggc gcg aaa gtt 96  
 Ile Gly Arg Ala Ile Ala Glu Thr Leu Ala Ala Arg Gly Ala Lys Val  
 20 25 30

att ggc act gcg acc agt gaa aat ggc gct cag gcg atc agt gat tat 144  
 Ile Gly Thr Ala Thr Ser Glu Asn Gly Ala Gln Ala Ile Ser Asp Tyr  
 35 40 45

tta ggt gcc aac ggc aaa ggt ctg atg ttg aat gtg acc gac ccg gca 192  
 Leu Gly Ala Asn Gly Lys Gly Leu Met Leu Asn Val Thr Asp Pro Ala  
 50 55 60

tct atc gaa tct gtt ctg gaa aaa att cgc gca gaa ttt ggt gaa gtg 240  
 Ser Ile Glu Ser Val Leu Glu Lys Ile Arg Ala Glu Phe Gly Glu Val  
 65 70 75 80

gat atc ctg gtc aat aat gcc ggt atc act cgt gat aac ctg tta atg 288  
 Asp Ile Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Thr Arg Asp Asn Leu Leu Met  
 85 90 95

cga atg aaa gat gaa gag tgg aac gat att atc gaa acc aac ctt tca 336  
 Arg Met Lys Asp Glu Glu Trp Asn Asp Ile Ile Glu Thr Asn Leu Ser  
 100 105 110

tct gtt ttc cgt ctg tca aaa gcg gta atg cgc gct atg atg aaa aag 384  
 Ser Val Phe Arg Leu Ser Lys Ala Val Met Arg Ala Met Met Lys Lys  
 115 120 125

cgt cat ggt cgt att atc act atc ggt tct gtg gtt ggt acc atg gga 432  
 Arg His Gly Arg Ile Ile Thr Ile Gly Ser Val Val Gly Thr Met Gly  
 130 135 140

aat ggc ggt cag gcc aac tac gct gcg gcg aaa gcg ggc ttg atc ggc 480  
 Asn Gly Gly Gln Ala Asn Tyr Ala Ala Ala Lys Ala Gly Leu Ile Gly  
 145 150 155 160

ttc agt aaa tca ctg gcg cgc gaa gtt gcg tca cgc ggt att act gta 528  
 Phe Ser Lys Ser Leu Ala Arg Glu Val Ala Ser Arg Gly Ile Thr Val  
 165 170 175

aac gtt gtt gct ccg ggc ttt att gaa acg gac atg aca cgt gcg ctg 576  
 Asn Val Val Ala Pro Gly Phe Ile Glu Thr Asp Met Thr Arg Ala Leu  
 180 185 190

agc gat gac cag cgt gcg ggt atc ctg gcg cag gtt cct gcg ggt cgc 624  
 Ser Asp Asp Gln Arg Ala Gly Ile Leu Ala Gln Val Pro Ala Gly Arg  
 195 200 205

ctc ggc ggc gca cag gaa atc gcc aac gcg gtt gca ttc ctg gca tcc 672  
 Leu Gly Gly Ala Gln Glu Ile Ala Asn Ala Val Ala Phe Leu Ala Ser  
 210 215 220

gac gaa gca gct tac atc acg ggt gaa act ttg cat gtg aac ggc ggg 720  
 Asp Glu Ala Ala Tyr Ile Thr Gly Glu Thr Leu His Val Asn Gly Gly  
 225 230 235 240

atg tac atg gtc tga 735  
 Met Tyr Met Val

<210> 3

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 3

aaaggatcca acaatgaatt ttgaaggaaa aatcgc

36

<210> 4

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 4

tgccctcgagt tatcagacca tgtacatccc gc

32

<210> 5

<211> 248

<212> PRT

<213> Bacillus subtilis

<400> 5

Met Asp Met Leu Asn Asp Lys Thr Ala Ile Val Thr Gly Ala Ser Arg

1	5	10	15
Gly Ile Gly Arg Ser Ile Ala Leu Ala Leu Ala Lys Ser Gly Ala Asn			
20	25	30	
Val Val Val Asn Tyr Ser Gly Asn Glu Ala Lys Ala Asn Glu Val Val			
35	40	45	
Asp Glu Ile Lys Ser Met Gly Arg Lys Ala Ile Ala Val Lys Ala Asp			
50	55	60	
Val Ser Asn Pro Glu Asp Val Gln Asn Met Ile Lys Glu Thr Leu Ser			
65	70	75	80
Val Phe Ser Thr Ile Asp Ile Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Thr Arg			
85	90	95	
Asp Asn Leu Ile Met Arg Met Lys Glu Asp Glu Trp Asp Asp Val Ile			
100	105	110	
Asn Ile Asn Leu Lys Gly Val Phe Asn Cys Thr Lys Ala Val Thr Arg			
115	120	125	
Gln Met Met Lys Gln Arg Ser Gly Arg Ile Ile Asn Val Ser Ser Ile			
130	135	140	
Val Gly Val Ser Gly Asn Pro Gly Gln Ala Asn Tyr Val Ala Ala Lys			
145	150	155	160



Ala Gly Val Ile Gly Leu Thr Lys Ser Ser Ala Lys Glu Leu Ala Ser  
165 170 175

Arg Asn Ile Thr Val Asn Ala Ile Ala Pro Gly Phe Ile Ser Thr Asp  
180 185 190

Met Thr Asp Lys Leu Ala Lys Asp Val Gln Asp Glu Met Leu Lys Gln  
195 200 205

Ile Pro Leu Ala Arg Phe Gly Glu Pro Ser Asp Val Ser Ser Val Val  
210 215 220

Thr Phe Leu Ala Ser Glu Gly Ala Arg Tyr Met Thr Gly Gln Thr Leu  
225 230 235 240

His Ile Asp Gly Gly Met Val Met  
245

<210> 6

<211> 747

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(747)

<400> 6

atg gat atg ctt aat gat aaa acg gct att gtc act ggc gca tcc cgc 48

Met Asp Met Leu Asn Asp Lys Thr Ala Ile Val Thr Gly Ala Ser Arg  
1 5 10 15

gga atc ggc cgc tca atc gcc ctt gct ctg gca aaa agc gga gca aat 96  
Gly Ile Gly Arg Ser Ile Ala Leu Ala Leu Ala Lys Ser Gly Ala Asn  
20 25 30

gtt gtc gtg aac tac tcc ggc aat gaa gcg aaa gca aat gaa gtg gta 144  
Val Val Val Asn Tyr Ser Gly Asn Glu Ala Lys Ala Asn Glu Val Val  
35 40 45

gat gaa atc aaa tca atg ggc aga aaa gca att gct gta aaa gcg gat 192  
Asp Glu Ile Lys Ser Met Gly Arg Lys Ala Ile Ala Val Lys Ala Asp  
50 55 60

gta tca aat ccc gaa gat gta caa aac atg ata aaa gaa aca ttg tct 240  
Val Ser Asn Pro Glu Asp Val Gln Asn Met Ile Lys Glu Thr Leu Ser  
65 70 75 80

gtt ttt tct acg att gac att ctg gtt aat aat gcg gga att aca aga 288  
Val Phe Ser Thr Ile Asp Ile Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Thr Arg  
85 90 95

gac aat ctc atc atg aga atg aaa gaa gac gaa tgg gat gac gtc att 336  
Asp Asn Leu Ile Met Arg Met Lys Glu Asp Glu Trp Asp Asp Val Ile  
100 105 110

aac att aac ctg aag ggt gtt ttc aac tgc aca aaa gct gtt aca aga 384  
Asn Ile Asn Leu Lys Gly Val Phe Asn Cys Thr Lys Ala Val Thr Arg

115	120	125	
caa atg atg aaa cag cgt tca ggc cgc att att aac gta tcg tct atc			432
Gln Met Met Lys Gln Arg Ser Gly Arg Ile Ile Asn Val Ser Ser Ile			
130	135	140	
gtc ggc gtc agc gga aac cct gga caa gcc aac tac gtg gct gca aaa			480
Val Gly Val Ser Gly Asn Pro Gly Gln Ala Asn Tyr Val Ala Ala Lys			
145	150	155	160
gcc ggc gtc atc ggt tta acc aaa tct tct gct aaa gag ctc gcc agc			528
Ala Gly Val Ile Gly Leu Thr Lys Ser Ser Ala Lys Glu Leu Ala Ser			
165	170	175	
cga aat att acg gta aac gca ata gcg cca gga ttt atc tca act gat			576
Arg Asn Ile Thr Val Asn Ala Ile Ala Pro Gly Phe Ile Ser Thr Asp			
180	185	190	
atg aca gat aaa ctt gca aaa gac gtt caa gac gaa atg ctg aaa caa			624
Met Thr Asp Lys Leu Ala Lys Asp Val Gln Asp Glu Met Leu Lys Gln			
195	200	205	
att ccg ctc gcg cgc ttt ggt gaa cct agc gat gtc agc agt gtt gtc			672
Ile Pro Leu Ala Arg Phe Gly Glu Pro Ser Asp Val Ser Ser Val Val			
210	215	220	
acg ttc cta gct tca gag gga gct cgt tat atg aca ggc caa acg ctt			720
Thr Phe Leu Ala Ser Glu Gly Ala Arg Tyr Met Thr Gly Gln Thr Leu			
225	230	235	240

cat att gac ggc gga atg gtg atg taa

747

His Ile Asp Gly Gly Met Val Met

245

<210> 7

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 7

ggaccatgga tatgcttaat gataaaacgg cta

33

<210> 8

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 8

gagaagcttc tcgagttaca tcaccattcc gccg

34

<210> 9

<211> 246

<212> PRT

<213> *Ralstonia eutropha*

<400> 9

Met Thr Gln Arg Ile Ala Tyr Val Thr Gly Gly Met Gly Gly Ile Gly

1 5 10 15

Thr Ala Ile Cys Gln Arg Leu Ala Lys Asp Gly Phe Arg Val Val Ala

20 25 30

Gly Cys Gly Pro Asn Ser Pro Arg Arg Glu Lys Trp Leu Glu Gln Gln

35 40 45

Lys Ala Leu Gly Phe Asp Phe Ile Ala Ser Glu Gly Asn Val Ala Asp

50 55 60

Trp Asp Ser Thr Lys Thr Ala Phe Asp Lys Val Lys Ser Glu Val Gly

65 70 75 80

Glu Val Asp Val Leu Ile Asn Asn Ala Gly Ile Thr Arg Asp Val Val

85 90 95

Phe Arg Lys Met Thr Arg Ala Asp Trp Asp Ala Val Ile Asp Thr Asn

100 105 110

Leu Thr Ser Leu Phe Asn Val Thr Lys Gln Val Ile Asp Gly Met Ala  
115 120 125

Asp Arg Gly Trp Gly Arg Ile Val Asn Ile Ser Ser Val Asn Gly Gln  
130 135 140

Lys Gly Gln Phe Gly Gln Thr Asn Tyr Ser Thr Ala Lys Ala Gly Leu  
145 150 155 160

His Gly Phe Thr Met Ala Leu Ala Gln Glu Val Ala Thr Lys Gly Val  
165 170 175

Thr Val Asn Thr Val Ser Pro Gly Tyr Ile Ala Thr Asp Met Val Lys  
180 185 190

Ala Ile Arg Gln Asp Val Leu Asp Lys Ile Val Ala Thr Ile Pro Val  
195 200 205

Lys Arg Leu Gly Leu Pro Glu Glu Ile Ala Ser Ile Cys Ala Trp Leu  
210 215 220

Ser Ser Glu Glu Ser Gly Phe Ser Thr Gly Ala Asp Phe Ser Leu Asn  
225 230 235 240

Gly Gly Leu His Met Gly  
245

<210> 10

<211> 741

<212> DNA

<213> *Ralstonia eutropha*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(738)

<400> 10

atg act cag cgc att gcg tat gtg acc ggc ggc atg ggt ggt atc gga 48

Met Thr Gln Arg Ile Ala Tyr Val Thr Gly Gly Met Gly Gly Ile Gly

1 5 10 15

acc gcc att tgc cag cgg ctg gcc aag gat ggc ttt cgt gtg gtg gcc 96

Thr Ala Ile Cys Gln Arg Leu Ala Lys Asp Gly Phe Arg Val Val Ala

20 25 30

ggt tgc ggc ccc aac tcg ccg cgc cgc gaa aag tgg ctg gag cag cag 144

Gly Cys Gly Pro Asn Ser Pro Arg Arg Glu Lys Trp Leu Glu Gln Gln

35 40 45

aag gcc ctg ggc ttc gat ttc att gcc tcg gaa ggc aat gtg gct gac 192

Lys Ala Leu Gly Phe Asp Phe Ile Ala Ser Glu Gly Asn Val Ala Asp

50 55 60

tgg gac tcg acc aag acc gca ttc gac aag gtc aag tcc gag gtc ggc 240

Trp Asp Ser Thr Lys Thr Ala Phe Asp Lys Val Lys Ser Glu Val Gly

65 70 75 80

gag gtt gat gtg ctg atc aac aac gcc ggt atc acc cgc gac gtg gtg 288



Glu Val Asp Val Leu Ile Asn Asn Ala Gly Ile Thr Arg Asp Val Val

85

90

95

ttc cgc aag atg acc cgc gcc gac tgg gat gcg gtg atc gac acc aac 336

Phe Arg Lys Met Thr Arg Ala Asp Trp Asp Ala Val Ile Asp Thr Asn

100

105

110

ctg acc tcg ctg ttc aac gtc acc aag cag gtg atc gac ggc atg gcc 384

Leu Thr Ser Leu Phe Asn Val Thr Lys Gln Val Ile Asp Gly Met Ala

115

120

125

gac cgt ggc tgg ggc cgc atc gtc aac atc tcg tcg gtg aac ggc cag 432

Asp Arg Gly Trp Gly Arg Ile Val Asn Ile Ser Ser Val Asn Gly Gln

130

135

140

aag ggc cag ttc ggc cag acc aac tac tcc acc gcc aag gcc ggc ctg 480

Lys Gly Gln Phe Gly Gln Thr Asn Tyr Ser Thr Ala Lys Ala Gly Leu

145

150

155

160

cat ggc ttc acc atg gca ctg gcg cag gaa gtg gcg acc aag ggc gtg 528

His Gly Phe Thr Met Ala Leu Ala Gln Glu Val Ala Thr Lys Gly Val

165

170

175

acc gtc aac acg gtc tct ccg ggc tat atc gcc acc gac atg gtc aag 576

Thr Val Asn Thr Val Ser Pro Gly Tyr Ile Ala Thr Asp Met Val Lys

180

185

190

gcg atc cgc cag gac gtg ctc gac aag atc gtc gcg acg atc ccg gtc 624

Ala Ile Arg Gln Asp Val Leu Asp Lys Ile Val Ala Thr Ile Pro Val

195

200

205

aag cgc ctg ggc ctg ccg gaa gag atc gcc tcg atc tgc gcc tgg ttg 672

Lys Arg Leu Gly Leu Pro Glu Glu Ile Ala Ser Ile Cys Ala Trp Leu

210

215

220

tcg tcg gag gag tcc ggt ttc tcg acc ggc gcc gac ttc tcg ctc aac 720

Ser Ser Glu Glu Ser Gly Phe Ser Thr Gly Ala Asp Phe Ser Leu Asn

225

230

235

240

ggc ggc ctg cat atg ggc taa

741

Gly Gly Leu His Met Gly

245

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 11

agtggatcca atgactcagc gcattgcgta

30

<210> 12

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 12

aacaagcttc tcgagtttagc ccatatgcag gccgc

35

<210> 13

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Sequence

<400> 13

aattctcgag taatctagag gaattctaaa a

31

<210> 14

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially

Synthesized Sequence

<400> 14

ctagtttttag aattcctcta gattactcga g

31

<210> 15

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 15

gaggaattca tacatgtatc cagatttaaa aggaa

35

<210> 16

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 16

ggtaagcttt cattaaccgc ggcctgcctg

30

<210> 17

<211> 806

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<220>

<221> CDS

<222> (12)..(794)

<400> 17

ggaattcata c atg tat cca gat tta aaa gga aaa gtc gtc gct att aca 50

Met Tyr Pro Asp Leu Lys Gly Lys Val Val Ala Ile Thr

1

5

10

gga gct gct tca ggg ctc gga aag gcg atg gcc att cgc ttc ggc aag 98

Gly Ala Ala Ser Gly Leu Gly Lys Ala Met Ala Ile Arg Phe Gly Lys

15

20

25

gag cag gca aaa gtg gtt atc aac tat tat agt aat aaa caa gat ccg 146

Glu Gln Ala Lys Val Val Ile Asn Tyr Tyr Ser Asn Lys Gln Asp Pro

30

35

40

45

aac gag gta aaa gaa gag gtc atc aag gcg ggc ggt gaa gct gtt gtc 194

Asn Glu Val Lys Glu Glu Val Ile Lys Ala Gly Gly Glu Ala Val Val

50

55

60

gtc caa gga gat gtc acg aaa gag gaa gat gta aaa aat atc gtg caa 242

Val Gln Gly Asp Val Thr Lys Glu Glu Asp Val Lys Asn Ile Val Gln

65

70

75

acg gca att aag gag ttc ggc aca ctc gat att atg att aat aat gcc 290

Thr Ala Ile Lys Glu Phe Gly Thr Leu Asp Ile Met Ile Asn Asn Ala

80

85

90

ggt ctt gaa aat cct gtg cca tct cac gaa atg ccg ctc aag gat tgg 338

Gly Leu Glu Asn Pro Val Pro Ser His Glu Met Pro Leu Lys Asp Trp

95

100

105

gat aaa gtc atc ggc acg aac tta acg ggt gcc ttt tta gga agc cgt 386

Asp Lys Val Ile Gly Thr Asn Leu Thr Gly Ala Phe Leu Gly Ser Arg

110

115

120

125

gaa gcg att aaa tat ttc gta gaa aac gat atc aag gga aat gtc att 434

Glu Ala Ile Lys Tyr Phe Val Glu Asn Asp Ile Lys Gly Asn Val Ile

130

135

140

aac atg tcc agt gtg cac gaa gtg att cct tgg ccg tta ttt gtc cac 482

Asn Met Ser Ser Val His Glu Val Ile Pro Trp Pro Leu Phe Val His

145

150

155

tat gcg gca agt aaa ggc ggg ata aag ctg atg aca gaa aca tta gcg 530

Tyr Ala Ala Ser Lys Gly Gly Ile Lys Leu Met Thr Glu Thr Leu Ala

160

165

170

ttg gaa tac gcg ccg aag ggc att cgc gtc aat aat att ggg cca ggt 578

Leu Glu Tyr Ala Pro Lys Gly Ile Arg Val Asn Asn Ile Gly Pro Gly  
175 180 185

gcg atc aac acg cca atc aat gct gaa aaa ttc gct gac cct aaa cag 626  
Ala Ile Asn Thr Pro Ile Asn Ala Glu Lys Phe Ala Asp Pro Lys Gln  
190 195 200 205

aaa gct gat gta gaa agc atg att cca atg gga tat atc ggc gaa ccg 674  
Lys Ala Asp Val Glu Ser Met Ile Pro Met Gly Tyr Ile Gly Glu Pro  
210 215 220

gag gag atc gcc gca gta gca gcc tgg ctt gct tcg aag gaa gcc agc 722  
Glu Glu Ile Ala Ala Val Ala Ala Trp Leu Ala Ser Lys Glu Ala Ser  
225 230 235

tac gtc aca ggc atc acg tta ttc gcg gac ggc ggt atg aca caa tat 770  
Tyr Val Thr Gly Ile Thr Leu Phe Ala Asp Gly Gly Met Thr Gln Tyr  
240 245 250

cct tca ttc cag gca ggc cgc ggt taatgaaagc tt 806  
Pro Ser Phe Gln Ala Gly Arg Gly  
255 260

<210> 18

<211> 261

<212> PRT

<213> Bacillus subtilis



<400> 18

Met Tyr Pro Asp Leu Lys Gly Lys Val Val Ala Ile Thr Gly Ala Ala

1 5 10 15

Ser Gly Leu Gly Lys Ala Met Ala Ile Arg Phe Gly Lys Glu Gln Ala

20 25 30

Lys Val Val Ile Asn Tyr Tyr Ser Asn Lys Gln Asp Pro Asn Glu Val

35 40 45

Lys Glu Glu Val Ile Lys Ala Gly Gly Glu Ala Val Val Val Gln Gly

50 55 60

Asp Val Thr Lys Glu Glu Asp Val Lys Asn Ile Val Gln Thr Ala Ile

65 70 75 80

Lys Glu Phe Gly Thr Leu Asp Ile Met Ile Asn Asn Ala Gly Leu Glu

85 90 95

Asn Pro Val Pro Ser His Glu Met Pro Leu Lys Asp Trp Asp Lys Val

100 105 110

Ile Gly Thr Asn Leu Thr Gly Ala Phe Leu Gly Ser Arg Glu Ala Ile

115 120 125

Lys Tyr Phe Val Glu Asn Asp Ile Lys Gly Asn Val Ile Asn Met Ser

130 135 140

Ser Val His Glu Val Ile Pro Trp Pro Leu Phe Val His Tyr Ala Ala

145	150	155	160
Ser Lys Gly Gly Ile Lys Leu Met Thr Glu Thr Leu Ala Leu Glu Tyr			
	165	170	175
Ala Pro Lys Gly Ile Arg Val Asn Asn Ile Gly Pro Gly Ala Ile Asn			
	180	185	190
Thr Pro Ile Asn Ala Glu Lys Phe Ala Asp Pro Lys Gln Lys Ala Asp			
	195	200	205
Val Glu Ser Met Ile Pro Met Gly Tyr Ile Gly Glu Pro Glu Glu Ile			
	210	215	220
Ala Ala Val Ala Ala Trp Leu Ala Ser Lys Glu Ala Ser Tyr Val Thr			
225	230	235	240
Gly Ile Thr Leu Phe Ala Asp Gly Gly Met Thr Gln Tyr Pro Ser Phe			
	245	250	255
Gln Ala Gly Arg Gly			
	260		

【図面の簡単な説明】

【図 1】

プラスミド pSE420D のマップである。P (trc) は、trc プロモーターを、T (rrn B) は rrnBT1T2 ターミネーターを、Amp はアンピシリン抵抗性を示す  $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子を、ori はプラスミドの複製起源を表す。

【図 2】

プラスミド pSG-ECR1 のマップである。P (trc) は、trc プロモーターを、EcfabG は大腸菌由来の  $\beta$  - ケトアシル A C P 還元酵素遺伝子を、BsGlcDH は枯草菌由来のグルコース脱水素酵素遺伝子を、T (rrnB) は rrnBT1T2 ターミネーターを、Amp はアンピシリン抵抗性を示す  $\beta$  - ラクタマーゼ遺伝子を、ori はプラスミドの複製起源を表す。

【図 3】

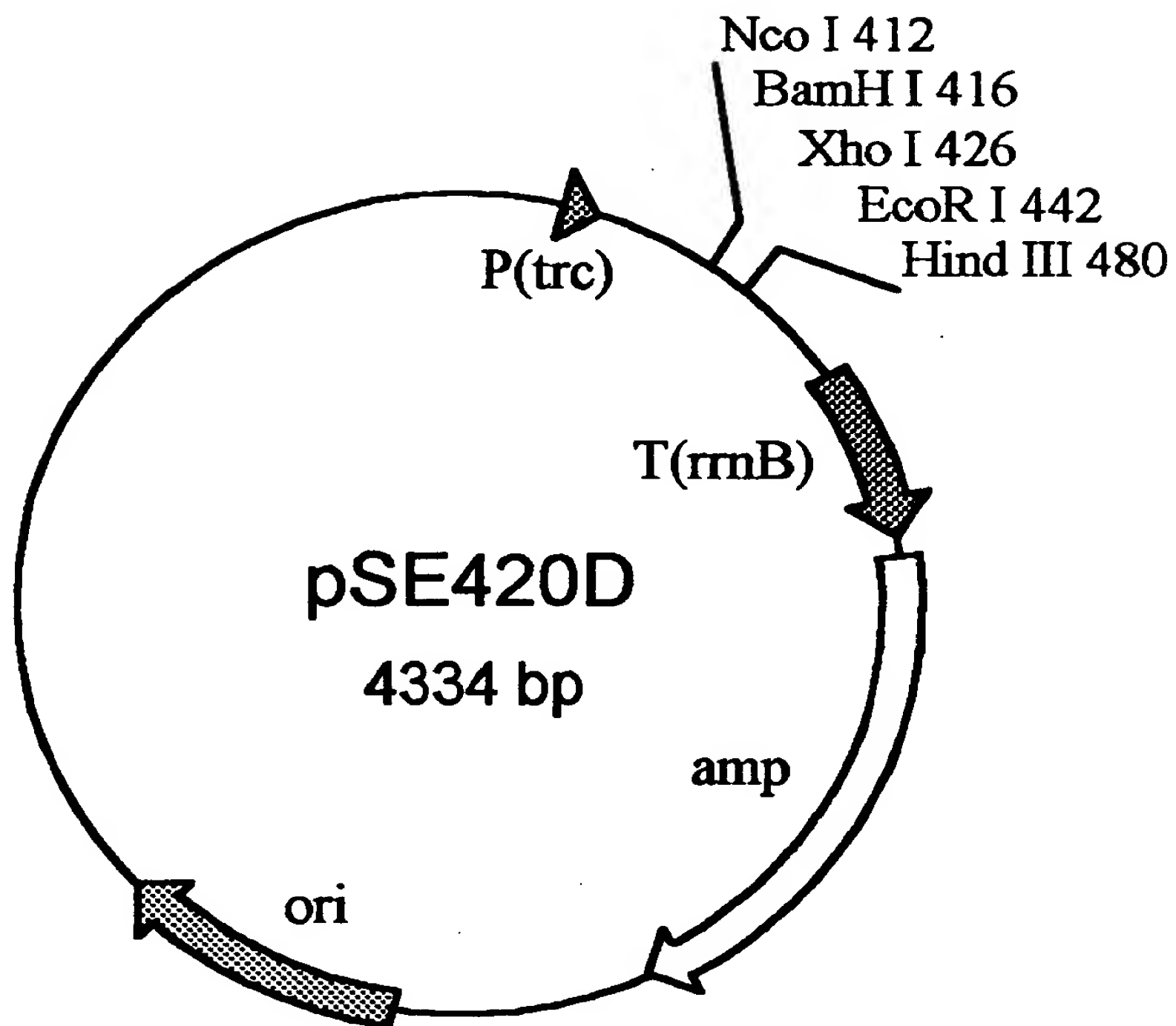
プラスミド pSG-BSR1 のマップである。P (trc) は、trc プロモーターを、BsfabG は枯草菌由来の  $\beta$  - ケトアシル A C P 還元酵素遺伝子を、BsGlcDH は枯草菌由来のグルコース脱水素酵素遺伝子を、T (rrnB) は rrnBT1T2 ターミネーターを、Amp はアンピシリン抵抗性を示す  $\beta$  - ラクタマーゼ遺伝子を、ori はプラスミドの複製起源を表す。

【図 4】

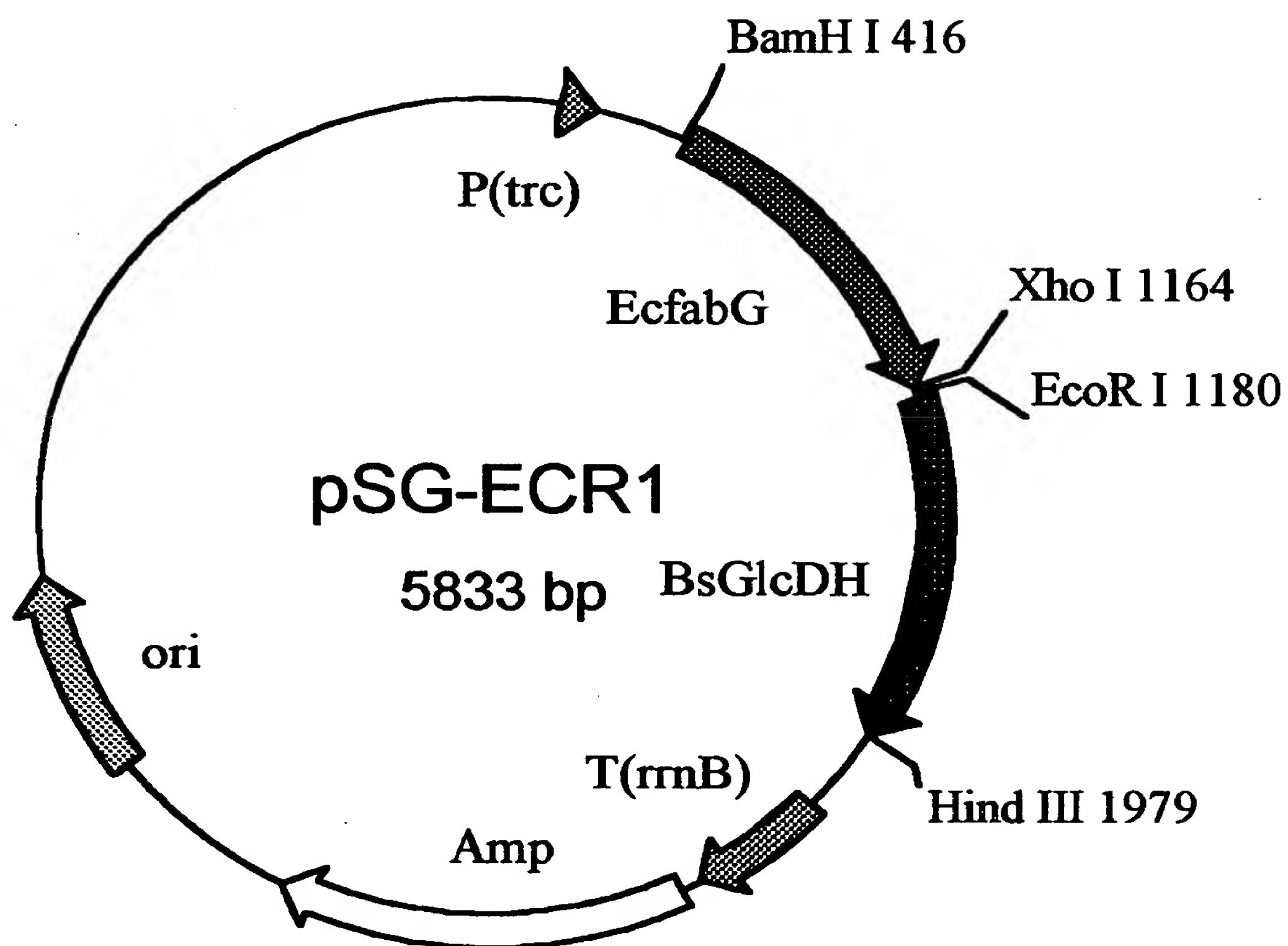
プラスミド pSG-AER1 のマップである。P (trc) は、trc プロモーターを、AephbB はラルストニア・ユートロファ由来のアセトアセチル - C o A 還元酵素遺伝子を、BsGlcDH は枯草菌由来のグルコース脱水素酵素遺伝子を、T (rrnB) は rrnBT1T2 ターミネーターを、Amp はアンピシリン抵抗性を示す  $\beta$  - ラクタマーゼ遺伝子を、ori はプラスミドの複製起源を表す。

【書類名】 図面

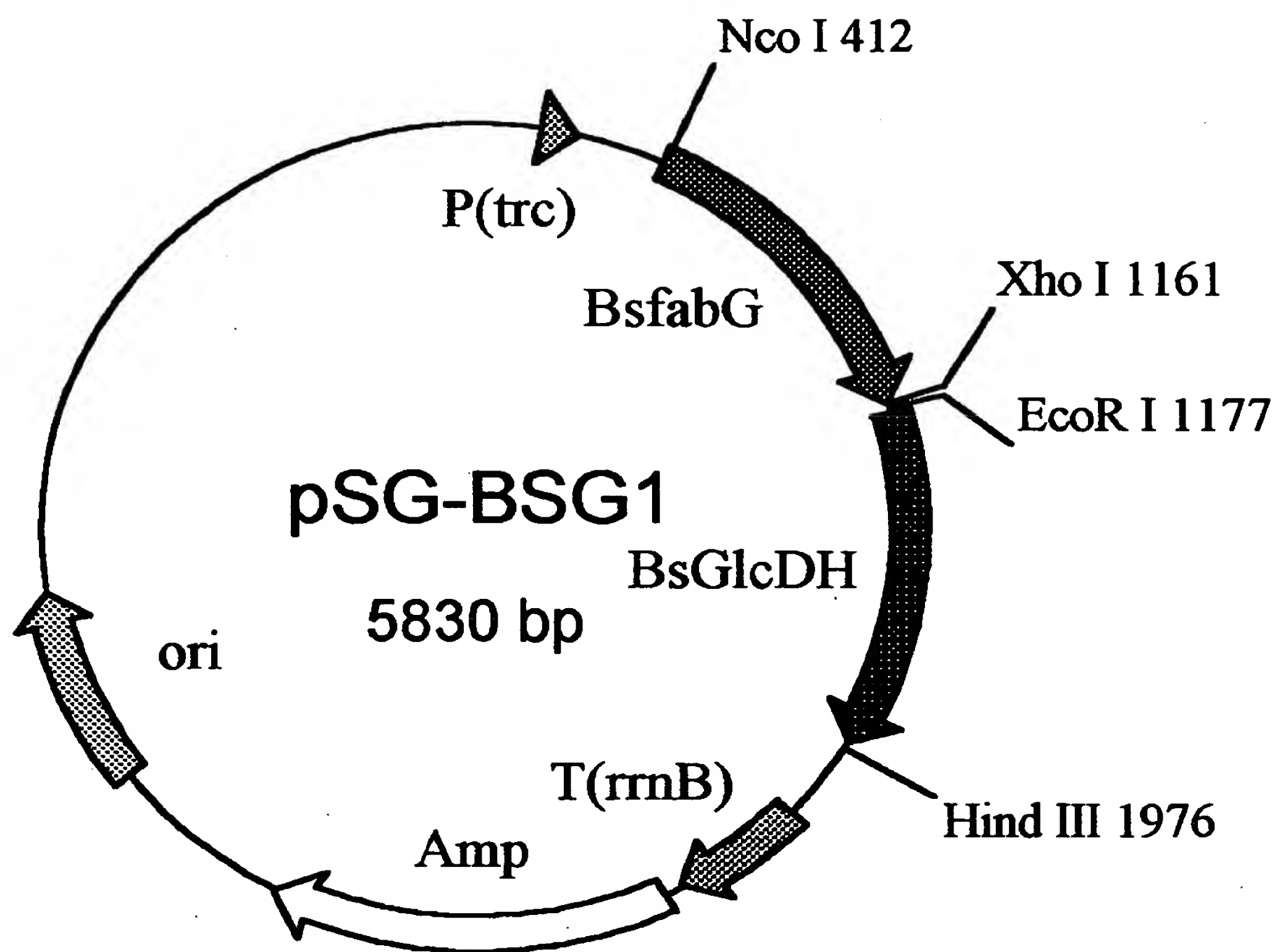
【図 1】



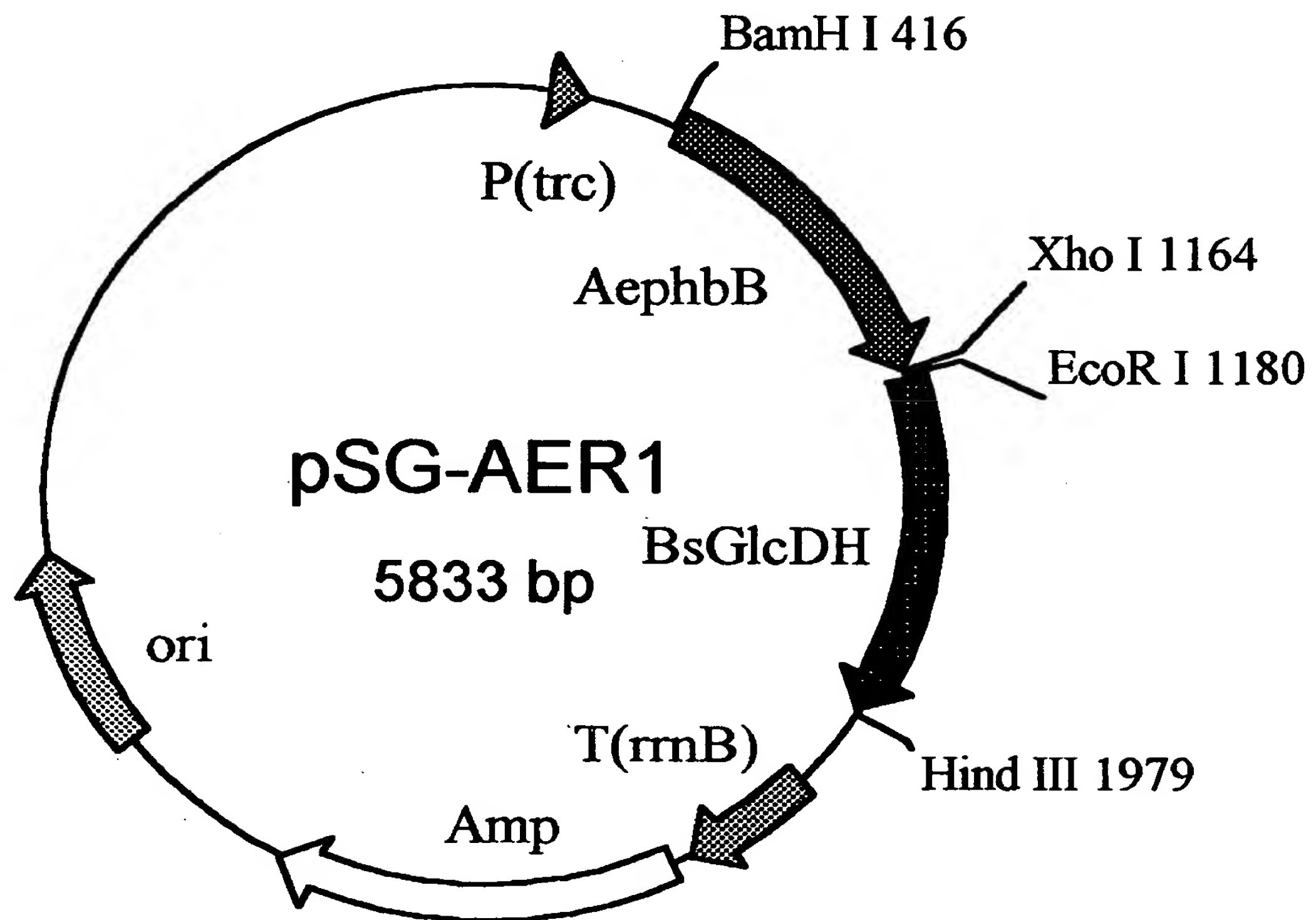
【図 2】



【図 3】



【図 4】





【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 効率的な(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルの製造方法を提供することを課題とする。

【解決手段】 II型の脂肪酸合成酵素に含まれる $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素またはポリ- $\beta$ -ヒドロキシ脂肪酸の生合成系を構成するアセトアセチル-CoA還元酵素の単離、およびその4-ハロアセト酢酸エステル還元活性の検討を行った結果、該酵素が、(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルに対し極めて高い還元活性および立体選択性を有することを見いだした。また、該酵素が、4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルエステルに対しては、いずれの立体配置に対してもほとんど酸化活性を示さず、4-クロロアセト酢酸エチル還元反応のみを行うことを見出した。

【選択図】 なし

特平 11-098205

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000002901]

1. 変更年月日

1990年 8月28日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府堺市鉄砲町1番地

氏 名

ダイセル化学工業株式会社